
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**AÇÃO BIOCIDA DO POLIQUILGERM® DERIVADO DO ÓLEO DE
Ricinus communis L. (mamona) SOBRE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA
FERMENTAÇÃO ETANÓLICA**

ARIANE CHRISTINE DEGASPERI BERTOLETTI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de Microbiologia Aplicada).

Maio - 2008

**AÇÃO BIOCIDA DO POLIQUILGERM[®] DERIVADO DO ÓLEO DE
Ricinus communis L. (mamona) SOBRE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA
FERMENTAÇÃO ETANÓLICA**

ARIANE CHRISTINE DEGASPERI BERTOLETTI

Orientadora: Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS
Co-orientadora: Profa. Dra. ANTONIA MARLI DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de Microbiologia Aplicada).

Maio - 2008

547.29 Bertoletti, Ariane Christine Degasperi
B546a Ação biocida do Poliquilgerm® derivado do óleo de
Ricinus communis L. (mamona) sobre bactérias
contaminantes da fermentação etanólica / Ariane Christine
Degasperi Bertoletti. - Rio Claro: [s.n.], 2008
74 f. : il., figs., tabs., gráfs., fots.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

Co-orientador: Antonia Marli dos Santos

1. Fermentação. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3.
Lactobacillus fermentum. 4. Agentes antimicrobianos. 5.
Contaminação bacteriana I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

DEDICO

*Aos meus pais queridos **Florivaldo e Sueli**,
A vocês que não bastaria um muito obrigado.
Que me ensinaram a viver com dignidade.
Que muitas vezes renunciaram sonhos
e não mediram esforços para que
eu e meu irmão realizássemos os nossos.
Pelo amor, apoio e confiança!*

Com todo meu amor e carinho...

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por me permitir a vida e pela força que me deu nos momentos em que eu acreditava que não iria conseguir. Vem Dele a verdadeira ciência, a verdadeira sabedoria, que leva o homem aos caminhos do conhecimento e descobertas em defesa da vida.

Ao meu irmão e amigo André, que em todo tempo torceu por mim, pelo seu carinho, paciência e auxílio na formatação deste trabalho.

Ao meu querido companheiro Carlos, que sempre esteve ao meu lado me ajudando, pelo seu amor, paciência, carinho e compreensão em todos os momentos.

Em especial a querida Professora Dra. Dejanira que com sua imensa sabedoria me orientou neste trabalho, pela amizade, apoio e confiança.

A minha co-orientadora Professora Dra. Marli, que sempre esteve à disposição para me ajudar, pela amizade e apoio em mais esta etapa da minha vida.

Ao Professor Dr. Antonio Carlos Simões Pião, pela disposição e ajuda no planejamento e análise estatística dos dados.

Aos Professores Dr. Gilberto e Dr. Salvador, que possibilitaram a realização deste trabalho, por todo auxílio durante este tempo.

A todos meus familiares que estiverem presente e torcendo por mim, em especial minha querida prima e amiga Thais.

Aos meus grandes amigos: Mara, Jeovana, Rita, Alex e Paula, que sempre torceram e me apoiaram para que eu chegasse aqui.

Aos meus queridos amigos e companheiros do curso: Cláudia, Marcela, Roberta, Mariane, Danilla, Ângela, Fabiana, César, Alex, Zito e Ricardo pela amizade e apoio durante todo o tempo. E aos demais amigos que estiveram ao meu lado neste período.

Ao amigo Ricardo Ventura que disponibilizou o lactímetro para ser utilizado nos experimentos e que sempre esteve à disposição para auxiliar no que fosse preciso.

A todos os funcionários e técnicos do departamento de Bioquímica e Microbiologia em especial: Inês, Luíza, Beto, Carmem e Dilza que sempre estiveram à disposição para ajudar, pela amizade e incentivo.

Ao CNPq e a Fundunesp pelo auxílio financeiro para a realização das pesquisas.

A todos àqueles que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Deus, não permita
Que eu seja o carrasco que sangra as ovelhas,
Nem uma ovelha nas mãos dos algozes.
Ajuda-me a dizer sempre a verdade na presença dos fortes
E jamais dizer mentiras para ganhar os aplausos dos fracos.
Meu Deus! Se me deres a fortuna, não me tires a felicidade.
Se me deres a força, não me tires a sensatez.
Se me for dado prosperar, não permita que eu perca a modéstia,
Conservando apenas o orgulho da dignidade.
Ajuda-me a apreciar o outro lado das coisas,
Para não enxergar a traição dos adversários,
Nem acusá-los com maior severidade do que a mim mesmo.
Não me deixes ser atingido pela ilusão da glória quando bem sucedido
E nem pelo desespero quando sentir o insucesso.
Lembra-me que a experiência de um fracasso
Poderá proporcionar um progresso maior.
Ó Deus! Faze-me sentir que o perdão é o maior índice da força
E que a vingança é prova de fraqueza.
Se me tirares a fortuna, deixe-me a esperança.
Se me faltar a beleza da saúde, conforta-me com a graça da fé.
E quando me ferir a ingratidão e a incompreensão dos meus semelhantes
Cria em minha alma a força da desculpa e do perdão.
E finalmente Senhor, se eu Te esquecer te rogo,
Mesmo assim, nunca Te esqueças de mim!”*

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVO	03
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3.1. Fermentação alcoólica	04
3.2. Contaminação nas dornas de fermentação.....	06
3.3. Flocculação.....	06
3.4. Conseqüências da contaminação por <i>Lactobacillus fermentum</i> e demais bactérias lácticas.....	09
3.5. Agentes antimicrobianos.....	12
3.6. Óleo de rícino.....	15
3.6.1. Ação antimicrobiana de derivados do óleo de rícino.....	16
4. MATERIAL E MÉTODO	18
4.1. Materiais	18
4.1.1.Microrganismos	18
4.1.2.Biocida	19
4.1.3.Meios de Cultura.....	19
4.2.Métodos	20
4.2.1. Preparo do meio de caldo de cana suplementado com nutrientes (CSN)	20
4.2.2.Manutenção das culturas.....	20
4.2.3.Cultivo dos microrganismos para os ensaios	21
4.2.4. Obtenção da cultura mista	21
4.3. Experimentos	23
4.3.1. Ensaio da viabilidade celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes concentrações de Poliquilgerm [®]	23

4.3.2. Concentração inibitória mínima (CIM) do <i>Lactobacillus fermentum</i> frente ao Poliquilgerm®	27
4.3.3. Verificação do desempenho do Poliquilgerm® quanto à inibição na produção de ácido láctico por <i>Lactobacillus fermentum</i> e “pool” de bactérias	30
4.3.4. Ação do Poliquilgerm® na fermentação com cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pura e em presença de bactérias contaminantes	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. Ensaio da viabilidade celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes concentrações de Poliquilgerm®	36
5.2. Concentração inibitória mínima (CIM) do <i>Lactobacillus fermentum</i> frente ao Poliquilgerm®	44
5.3. Verificação do desempenho do Poliquilgerm® quanto à inibição na produção de ácido láctico por <i>Lactobacillus fermentum</i> e “pool” de bactérias	49
5.4. Ação do Poliquilgerm® na fermentação com cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pura e em presença de contaminantes	54
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS	66

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Protocolo experimental dos tratamentos com Poliquilgerm [®] (ppm) para verificar a viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , em meio Sabouraud líquido, incubada a 28°C, nos tempos estudados (0; 24; 48 e 72h).	25
2. Protocolo dos tratamentos com Poliquilgerm [®] (ppm) para verificar a concentração mínima inibitória de <i>Lactobacillus fermentum</i> , em meio MRS líquido, incubado a 35°C, nos tempos estudados (0; 24; 48 e 72h).	28
3. Protocolo para quantificação do ácido láctico nos tratamentos com do Poliquilgerm [®] (ppm) sobre <i>Lactobacillus fermentum</i> e “pool” de bactérias em meio CSN líquido 10°Brix, incubado a 30°C, por 24h	31
4. Tratamentos com Poliquilgerm [®] (ppm) sobre a fermentação com cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pura e em presença de bactérias contaminantes em meio CSN líquido 10°Brix, cultivado em erlenmeyer a 30 ± 1°C e sob agitação de 100 ± 10rpm.	34
5. Análise da variância com dois fatores de variação (p < 0,001) para comparação entre os tempos de contato (4), concentração de Poliquilgerm [®] (8) e interação entre esses fatores sobre a viabilidade celular, taxa de brotamento e viabilidade dos brotos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
6. Teste de Tukey (p < 0,05) para comparação múltipla entre as médias dos tempos de contato com o biocida para viabilidade celular, taxa de brotamento e viabilidade dos brotos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
7. Teste de Tukey (p < 0,05) para análise da ação do Poliquilgerm [®] comparando as médias entre as concentrações sobre a viabilidade celular, taxa de brotamento e viabilidade dos brotos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
8. Análise da variância com dois fatores (p < 0,001) do logaritmo de UFC/mL de <i>Lactobacillus fermentum</i> para comparação entre os tempos de contato (4), concentração de Poliquilgerm [®] (5) e interação entre esses fatores.	45
9. Teste de Tukey (p < 0,05) para comparação entre as médias do logaritmo de UFC/mL dos tempos de contato com Poliquilgerm [®] sobre a viabilidade de <i>Lactobacillus fermentum</i>	46

10. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação entre as médias do logaritmo de UFC/mL das concentrações de Poliquilgerm [®] sobre a viabilidade de <i>Lactobacillus fermentum</i>	46
11. Resultados do teste de reversão de <i>Lactobacillus fermentum</i> , cultivado em meio MRS a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, avaliados após 24 e 48 horas de incubação pela visualização da turbidez do meio indicando ou não crescimento, onde (+) turvo (-) não turvo.....	48
12. Análise da variância fatorial 5x6 ($p < 0,001$) para comparação entre as culturas (5) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Lactobacillus fermentum</i> ; “pool” de bactérias e associação entre elas; concentrações de Poliquilgerm [®] (6) e interação entre esses fatores, no teste de produção de ácido láctico	51
13. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparar a ação do Poliquilgerm [®] sobre o desempenho metabólico entre as médias da produção de ácido láctico das culturas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Lactobacillus fermentum</i> ; “pool” de bactérias e associação entre estas culturas	51
14. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparar a ação de diferentes concentrações do Poliquilgerm [®] entre as médias da produção de ácido láctico pelas culturas puras e associação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> “pool” de bactérias.....	52
15. Resultados do teste de fermentação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com tubo de Durhan, onde (+) fermentou e (-) não fermentou, após 24 e 48 horas de cultivo a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ em meio CSN a 10°Brix	53
16. Análise da variância fatorial 3x5 ($p < 0,001$) para comparação entre as culturas (3) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; “pool” de bactérias e associação entre elas; as concentrações de Poliquilgerm [®] (5) e interação entre esses fatores, durante etapa fermentativa de 13h, a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$	54
17. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparar a ação do Poliquilgerm [®] sobre o desempenho das culturas de “pool” de bactérias + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e “pool” de bactérias no teste de produção de álcool.	55
18. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparar a ação do Poliquilgerm [®] entre as médias das concentrações estudadas no teste de produção de álcool pelas	

culturas de “pool” de bactérias; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e associação das duas culturas	55
19. Viabilidade percentual média do inóculo inicial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para realização dos testes de fermentação, cultivado em meio CSN 10°Brix, por 24h a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$	56
20. Viabilidade média do inóculo inicial do “pool” de bactérias, para realização dos testes de fermentação, cultivado em meio CSN 10°Brix, por 24h a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$	56
21. Alterações nos níveis de pH da cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , acompanhado durante 13 horas de fermentação em meio CSN a 10°Brix a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$	62
22. Alterações nos níveis de pH da cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mais “pool” de bactérias, acompanhado durante 13 horas de fermentação em CSN a 10°Brix a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$	62
23. Alterações nos níveis de pH da cultura do “pool” de bactérias, acompanhado durante 13 horas de fermentação em CSN 10°Brix, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$	63

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Esquema simplificado da fermentação alcoólica a partir de uma molécula de glicose (CALDWELL, 1995).....	5
2. Esquema da produção de ácido láctico pelas bactérias heterofermentativas como as do gênero <i>Lactobacillus</i> (SALOVAARA, 1998).	10
3. Estrutura do triglicerídeo: ácido ricinoléico, o principal componente do óleo de rícino.	15
4. Esquema para obter a cultura mista de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e “pool” de bactérias.	22
5. Esquema do ensaio de quantificação para porcentagem da viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
6. Esquema do ensaio de concentração inibitória mínima (MIC) do <i>Lactobacillus fermentum</i>	29
7. Esquema do ensaio para dosagem de ácido láctico produzido.	32
8. Teste da viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na presença do Poliquilgerm [®] nas concentrações 0; 10; 50; 100 e 200 ppm respectivamente nos tubos da esquerda para direita, durante 24(a); 48(b) e 72(c) horas cultivado em meio de Sabouraud líquido a $28 \pm 1^\circ\text{C}$	37
9. Variação média e desvio padrão da viabilidade celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em função do tempo de contato e concentração do Poliquilgerm [®] cultivado em meio de Sabouraud líquido a $28 \pm 1^\circ\text{C}$	41
10. Variação média e desvio padrão da taxa de brotamento da cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em função do tempo de contato e concentração do Poliquilgerm [®] cultivado em meio de Sabouraud líquido a $28 \pm 1^\circ\text{C}$	42
11. Variação média e desvio padrão da viabilidade dos brotos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em função do tempo de contato e concentração do Poliquilgerm [®] cultivado em meio de Sabouraud líquido a $28 \pm 1^\circ\text{C}$	43
12. Variação média e desvio padrão do número de flocos <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em função do tempo de contato e concentração do Poliquilgerm [®] cultivado em meio de Sabouraud líquido a $28 \pm 1^\circ\text{C}$	44

13. Variação média e desvio padrão da viabilidade <i>Lactobacillus fermentum</i> cultivado em meio MRS a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ em função do tempo de contato e concentração do Poliquilgerm [®]	47
14. Variabilidade média e desvio padrão da dosagem de ácido láctico (mmol/L) nas concentrações de Poliquilgerm [®] estudadas sobre as culturas puras e mistas de <i>Lactobacillus fermentum</i> , “pool” de bactérias, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a após 24 horas de cultivo em meio CSN a 10°Brix a $30 \pm 1^\circ\text{C}$	53
15. Variabilidade média e desvio padrão da produção de álcool das culturas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mais “pool” de bactérias, nas concentrações estudadas de Poliquilgerm [®] , cultivadas em meio CSN 10°Brix durante 13h, a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ sob agitação de 100 ± 10 rpm.	58
16. Média e desvio padrão do consumo do açúcar expresso em °Brix da cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , acompanhado durante 13h de fermentação, cultivado em meio CSN a 10°Brix a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de 100 ± 10 rpm.	59
17. Média e desvio padrão do consumo do açúcar expresso em °Brix, da cultura mista de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com “pool” de bactérias, acompanhado durante 13h de fermentação em meio CSN a 10°Brix a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de 100 ± 10 rpm.	60
18. Concentração de glicose residual (mg/mL) frente à ação do Poliquilgerm [®] conforme cada tratamento em 13h de fermentação em meio CSN a 10°Brix a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de 100 ± 10 rpm. a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ sob agitação de 100 ± 10 rpm. O controle empregado foi o meio CSN a 10°Brix sem inóculo.	61

RESUMO

O óleo extraído das sementes de *Ricinus communis* L. (mamona) é um triglicerídeo rico em ácidos graxos, com a presença dominante do ácido ricinoléico, 89,5% e que confere ao óleo de mamona características peculiares. Mediante a síntese química deste óleo foi desenvolvido o Poliquilgerm[®] (POL), produto que segundo estudos realizados apresenta ação antimicrobiana. Como verificado em casos no campo odontológico; sobre *Escherichia coli* e *Candida albicans*, além de outros trabalhos na área de fermentação etanólica. Desta forma este trabalho teve como objetivo testar “in vitro” o POL no controle de bactérias contaminantes de dornas de fermentação e sobre a viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae*, buscando assim minimizar as perdas na produção de álcool. Para a realização dos testes utilizaram-se culturas puras e mistas de *S. cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum* e “pool” de bactérias isoladas de processo fermentativo. Analisou-se o efeito do POL sobre a viabilidade da levedura; na concentração inibitória mínima para *L. fermentum*; na produção de ácido láctico e na fermentação. As concentrações de POL variaram conforme cada teste entre: 0; 0,5; 1; 5; 10; 20; 50; 100; 200 ppm. O POL apresentou ação microbiocida contra a levedura na concentração 200 ppm abaixo deste valor exerceu atividade microbiostática. Sobre *L. fermentum* concentrações acima de 50 ppm foi suficiente para eliminar a bactéria. Em 20 ppm verificou-se significativa diminuição de ácido láctico nas culturas puras das bactérias contaminantes e em associação com *S. cerevisiae*, com inibição média de 90%. Na

concentração 5 ppm houve uma diminuição média de 50% na produção de ácido láctico em todas as culturas testadas. Analisando os dados obtidos neste trabalho, concluiu-se que o POL apresenta grande potencial para ser usado como biocida alternativo na indústria sucro-alcooleira especialmente no controle da produção de ácido láctico.

Palavras-chave: fermentação etanólica; *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactobacillus fermentum*; biocida; Poliquilgerm[®]; óleo de mamona.

ABSTRACT

The oil extracted from seeds of *Ricinus communis* L. (castor plant) is a triglyceride rich in fatty acids, with the dominant presence of ricinoleic acid, 89.5% that gives it especial characteristics. Poliquilgerm[®] (POL) was developed through chemical synthesis of the oil and according to studies this product shows antimicrobial action. It was observed in cases in the odontologic field; on *Escherichia coli* and *Candida albicans*, and also in some researches in ethanolic fermentation area. Therefore this study aimed to test the POL for in vitro control of bacteria contaminants of the fermentation process and on the viability of *Saccharomyces cerevisiae*, seeking thereby minimize the losses on alcohol production. Tests were done with pure and mixed cultures of *S. cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum* and a pool of bacteria from fermentation process. The effect of POL on yeast viability; was analyzed on the minimum inhibitory concentration for *L. fermentum*; on production of lactic acid and on fermentation processes. Concentrations of POL varied in each test between: 0; 0.5; 1; 5; 10; 20; 50; 100 and 200 ppm. POL's microbiocidal action was observed against yeast in the concentration of 200 ppm below this value microbiostatic activity was noticed. On *L. fermentum* concentrations above 50 ppm were sufficient to eliminate the bacteria. Significant reduction of lactic acid was observed with 20 ppm POL in pure cultures of bacteria contaminants and in association with *S. cerevisiae*, with inhibition average of 90%. Under 5 ppm concentration, there was average decrease of 50% in the production of lactic acid in all cultures studied. Analyzing the data obtained in this study, it was

concluded that POL presents great potential to be applied as alternative biocide in the sugar and alcohol industry, especially in the control of lactic acid production.

Keywords: ethanolic fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactobacillus fermentum*; biocide; Poliquilgerm[®]; castor oil.

1. INTRODUÇÃO

Desde a implantação do Programa Nacional do Álcool, o Pró-álcool, na década de 70, houve a necessidade de se desenvolver e melhorar as condições para ampliar a produção de álcool no Brasil. Com isso o avanço da tecnologia para a indústria sucroalcooleira foi inevitável induzindo benefícios econômicos para o país.

Além do mais há a preocupação imediata quanto ao cumprimento do Tratado de Kyoto, acordo este em que as nações desenvolvidas devem diminuir em 5,2% as emissões de dióxido de carbono, dentre outros gases poluentes, até 2012, isso aumentou a necessidade de um transporte sustentável estimulando assim a busca por combustíveis limpos. Nesse cenário entra o bioetanol, derivado de fontes renováveis. O crescente uso do etanol também é comprovado com o constante aumento da frota de automóveis com motor flexível, como opção de um combustível mais econômico.

Nessa realidade, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e com menores custos de produção, isso explica o crescimento no número de usinas, em especial na região sudeste, que atualmente incorporam novas tecnologias visando melhor obtenção e rendimento do açúcar e do álcool. Estudos vêm sendo realizados por diversos centros de pesquisa com a finalidade de aperfeiçoar técnicas para o plantio, a colheita e a obtenção do açúcar e do etanol.

Embora o crescimento neste setor seja cada vez maior e mais especializado, no que se referem à obtenção dos produtos, as indústrias ainda enfrentam dificuldades no processo de fermentação com a presença de contaminantes: bactérias e leveduras.

Quando o índice de contaminação é elevado nas dornas pode acarretar uma produção economicamente inviável, pelo significativo decréscimo no rendimento etanólico.

Na tecnologia usada atualmente nas indústrias sucro-alcooleiras é praticamente impossível impedir a contaminação nas dornas de fermentação. Esta pode vir principalmente com as águas de lavagem da cana de açúcar, pois é comum a presença de microrganismos que vivem no solo e em todas as partes da planta. Como o caldo é uma rica fonte de carbono, torna-se um excelente meio de cultura para leveduras e bactérias. O número total de contaminantes presentes no caldo bruto de cana-de-açúcar pode ser aumentado sensivelmente tanto por períodos prolongados entre o corte e a moagem da planta como pela falta de assepsia nas moendas, filtros, bombas e tubulações que entram em contato direto com o referido material. Além disso, o atual processo de produção descrito por Mélite-Boinot envolve o reaproveitamento das leveduras por centrifugação, conseqüentemente há também, o reciclo dos contaminantes, que perpetuam o problema.

A contaminação durante a fermentação etanólica induz entre outros inconvenientes, o decréscimo na produção de álcool. Diversos fatores podem causar este prejuízo, como: disputa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* pelo substrato com os contaminantes, consumo do álcool produzido, produção de metabólitos tóxicos à levedura, bem como ácidos orgânicos e gomas e podem provocar também a floculação do fermento.

Com o intuito de combater as constantes contaminações que ocorrem nas moendas e dornas as indústrias alcooleiras usam isoladamente ou combinados antibióticos, biocidas ou outros produtos químicos. Nas unidades de produção de etanol com reciclo de células, usualmente emprega-se o ácido sulfúrico para eliminar as bactérias e substâncias aderidas às leveduras. Porém o uso contínuo desse produto sem cuidadoso controle pode provocar a morte das células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Desta forma, encontrar novas tecnologias que sirvam de alternativa para resolução deste problema é um desafio para a microbiologia aplicada, uma vez que é de grande importância econômica, devido às perdas causadas pelas contaminações na indústria alcooleira.

2. OBJETIVO

A sensibilidade de contaminantes bacterianos frente a novos agentes antimicrobianos tem sido largamente estudada na indústria sucro-alcooleira. Desta forma, com a finalidade de se encontrar um novo biocida e minimizar as perdas no processo de produção de etanol, este trabalho teve como objetivo verificar a ação antimicrobiana de uma nova substância: o Poliquilgerm[®], produto derivado do óleo de mamona (*Ricinus communis* L.) sobre a microbiota da fermentação etanólica.

Objetivos específicos

- Testar a viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* sob a ação do Poliquilgerm[®];
- Verificar a concentração inibitória mínima (CIM) do Poliquilgerm[®] para o *Lactobacillus fermentum*;
- Verificar o desempenho do Poliquilgerm[®] quanto à inibição na produção de ácido láctico por *Lactobacillus fermentum* e “pool” de bactérias contaminantes isoladas de dornas de fermentação etanólica;
- Testar a ação do Poliquilgerm[®] durante processo fermentativo com cultura de *Saccharomyces cerevisiae* pura e em presença de bactérias contaminantes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1.Fermentação alcoólica

O processo de fermentação alcoólica é uma reação química de oxi-redução anaeróbia, onde o equilíbrio energético é conservado. Mediante este fenômeno os açúcares são transformados em álcool e gás carbônico, por ação das leveduras pela via glicolítica. A fermentação do mosto realiza-se em três fases distintas: pré-fermentação, fermentação e pós-fermentação.

A pré-fermentação tem início quando o fermento é adicionado ao mosto devidamente preparado, e caracteriza-se por ativa multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio. Após 5 a 6 horas, com pouca espuma, inicia-se a fermentação principal, que é reconhecida pela elevação rápida da temperatura, diminuição da densidade do mosto por causa do desaparecimento dos açúcares e da formação equivalente do álcool. A acidez eleva-se abaixando o pH. Essa fase termina quando desaparecem as espumas, dentro de 9 a 10 horas. A pós-fermentação é caracterizada pela diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, diminuição do desprendimento do gás carbônico e não se formam mais espumas. Essa fase dura de 6 a 8 horas; e deve permanecer o mínimo possível para evitar a infecção do vinho e do fermento. O mosto totalmente fermentado é denominado vinho (CECCATO-ANTONINI, 2004).

O processo de fermentação etanólica nas indústrias sucro-alcooleiras é realizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, no qual uma molécula de glicose é metabolizada transformando-se em duas de dióxido de carbono e duas de etanol (FIGURA 1). O ácido pirúvico (3C) é descarboxilado e, assim, liberta CO_2 e origina uma molécula de acetaldeído, que é reduzida a etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$). Essa redução deve-se à transferência de elétrons do NADH, formado durante a glicólise, que passa à sua forma oxidada (NAD^+), podendo ser novamente reduzido. O rendimento energético final é de 2 ATP formados durante a glicólise.

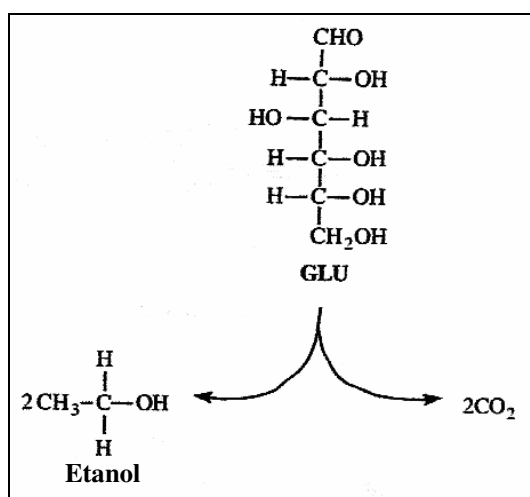


Figura 1. Esquema simplificado da fermentação alcoólica a partir de uma molécula de glicose (CALDWELL, 1995).

As tecnologias usadas nas indústrias de fermentação podem ser processos contínuos ou descontínuos conhecido também como batelada. Hoje, no Brasil, a maioria das usinas segue o modelo sugerido por Mèlle-Boinot, onde há o reaproveitamento do fermento por centrifugação do vinho. Que em seguida sofre um tratamento com ácido sulfúrico até atingir pH 2,0 a 3,0 com tempo variável em até 3 horas. O tratamento ácido induz a descontaminação bacteriana e química das células, como por exemplo, desfloculação causada por *L. fermentum*, metais pesados e outros compostos que se ligam à parede celular e deixam a levedura intoxicada, prejudicando a absorção de *S. cerevisiae*. Porém, quanto maior o tempo que as leveduras ficam expostas ao ácido menor a viabilidade celular. Além disso, o uso contínuo desse produto pode causar

corrosão nos equipamentos, comprometendo a segurança pessoal e gerando instabilidade no sistema quando, por exemplo, ocorrem alterações drásticas de pH que é um dos fatores que mais causa estresse a levedura (DORTA et al., 2006).

3.2. Contaminação nas dornas de fermentação

Os microrganismos estão presentes nas raízes, colmos e folhas das plantas e no solo. Durante a extração do caldo a contaminação bacteriana é inevitável (HERNÁNDEZ, 2002). Além do mais na tecnologia usada atualmente nas indústrias sucro-alcooleiras é praticamente impossível impedir que contaminantes cheguem às dornas de fermentação.

A contaminação acarreta muitos problemas durante a fermentação etanólica com isso há um decréscimo na produção de álcool. Por diversas formas esses contaminantes dificultam o processo de fermentação, dentre as quais se destacam: a competição pelo substrato, açúcar e álcool; algumas bactérias são produtoras de goma como as do gênero *Leuconostoc*, que causam o aumento da viscosidade do caldo, podendo causar entupimento das tubulações, centrífugas, peneiras e trocadores de calor; produção de toxinas e ácidos orgânicos no meio que podem causar diminuição e morte das células de *S. cerevisiae*; outras bactérias, como *Lactobacillus fermentum*, que além da produção de ácido láctico, aderem-se as leveduras produzindo o efeito de floculação causando perda das células que sedimentam nos fundos das dornas ou na centrifugação ou são carregadas para superfície do caldo durante a fermentação (WHITE e KIDNEY, 1981, LUDWIG, 1998; NOBRE et al., 2007); e excesso de produtos utilizados para combater a contaminação. Às vezes a contaminação é tão alta que a perda do fermento é inevitável sendo necessário reiniciar todo processo (GARCIA, 1999). Por isso, há tanto interesse em controlar a contaminação, especialmente a bacteriana, com a finalidade de obter maiores rendimentos na produção do álcool.

3.3. Floculação

A floculação é um processo que ocorre entre células microbianas individuais em suspensão que se agregam entre si formando flocos que em seguida sedimentam ou

flotam. Quando esse efeito ocorre entre células da mesma espécie denomina-se auto floculação, e quando ocorre entre diferentes espécies é denominada co-floculação (ESSER e KUES, 1983 *apud* HERNÁNDEZ, 2002). O termo floculação é mais comumente usado, podendo variar entre autores, como aderência, aglomeração, aglutinação, coagulação, flotação, entre outros (LUDWIG, 1998; GARCIA, 1999).

Auto floculação é usado para descrever a propriedade apresentada por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis* que se agregam espontaneamente no final da fermentação ou na fase estacionária do crescimento microbiano, formando flocos que sedimentam ou flotam (LUDWIG, 1998; HERNÁNDEZ, 2002). Neste caso a interação célula-célula, é um dos fatores que participam da floculação das leveduras, podendo ser controlada primariamente por genes *FLO*, cujo mecanismo de ação parece estar ligado à ativação de lectinas presentes na superfície da membrana das células da levedura, responsáveis pela forte ligação às mananas das células adjacentes (JAVADEKAR et al., 2000).

A presença de íons bivalentes como Ca^{2+} e Mn^{2+} , está ligada à floculação. Eles são considerados co-fatores para que esse fenômeno ocorra (STRATFORD, 1993; LUDWIG, 1998).

A floculação é visível no cultivo de suspensões concentradas, que se transformam em uma fina camada de células que flotam no meio, a camada tende a ficar mais espessa e mais densa. Então os flocos separam-se por sedimentação ou flotação, que ocorre decorrente da união dos flocos com bolhas de gás produzidas na fermentação (GARCIA, 1999).

Embora a formação de flocos seja um fenômeno natural e às vezes benéfico, como no caso da produção de cervejas e aguardentes, facilitando a retirada do mosto no final da fermentação, tornando a bebida mais “limpa” e garantindo alta produtividade. A floculação pode ser um grave problema quando induzida por contaminantes nas dornas, pois a formação dos flocos não ocorrerá de maneira natural ao fim do processo devido à falta de substrato, mas durante toda fermentação, causando prejuízos e perdas do fermento ativo.

A floculação é bastante estudada, pois é um fenômeno importante que interfere diretamente na produtividade de indústrias de etanol, uma vez que a eficiência do processo de conversão máxima de açúcar em etanol e CO_2 dependem do número de

células ativas no mosto, suspensas no líquido de fermentação e não floculadas. Se as células estão agregadas à superfície de contato entre as leveduras, o substrato disponível fica menor, diminuindo assim o processo de conversão. Este fenômeno pode causar perdas de células na centrifuga e o conseqüente gasto de substrato para a reposição celular, determinando assim, queda no rendimento alcoólico, (WHITE e KIDNEY, 1981).

Diversos fatores podem causar a floculação, sendo que, um dos mais freqüentes é o contato entre microrganismos que induzem esse efeito. As bactérias lácticas são as principais promotoras de fermentações indesejáveis durante a produção de etanol. A presença de contaminantes agrava-se devido o uso do processo de reciclo de células, pois os contaminantes também são reciclados junto causando significativas perdas no rendimento alcoólico e inclusive baixando a viabilidade de leveduras (MARQUES e SERRA, 2004). Esse processo pode acelerar quando há movimentação do meio, a colisão entre as células facilita a adesão entre elas. Resultados de testes de floculação do fermento (*S. cerevisiae*) por *L. fermentum* indicaram que há aumento crescente do grau de floculação com aumento da concentração de bactérias na mistura. A partir da concentração de 1,38g/L (biomassa seca) bactéria para 65,4g/L (biomassa seca) de levedura há uma nítida separação de fases, semelhante àquela encontrada nas destilarias com altos índices de infecção bacteriana e floculação. O tempo de reação para formação dos flocos é inferior a 15 minutos, ou seja, quase instantânea. Assim, para a detecção rápida de bactérias indutoras de floculação em dornas de fermentação é suficiente o tempo máximo de 35 min. (LUDWIG et al., 2001).

Para o controle da infecção bacteriana e de suas conseqüências no processo de obtenção de etanol visando uma fermentação eficiente, é fundamental a busca de soluções práticas e viáveis para atenuar ou eliminar a floculação do fermento nas indústrias sucro-alcooleiras, desta forma diminuindo os custos operacionais da produção. Contudo apesar dos problemas causados pela contaminação, ainda não há métodos eficientes e seguros de controle industrial para evitar que isso ocorra.

3.4. Consequências da contaminação por *Lactobacillus fermentum* e demais bactérias lácticas

Grandes perdas nas indústrias alcooleiras estão relacionadas ao fracasso no processo de fermentação etanólica devido à presença de bactérias gram-positivas que formam ácido lático e ácido acético entre outros ácidos orgânicos, além disso, também estão relacionadas à floculação das leveduras (LUDWIG, 1998; CHERUBIN, 2003).

A degradação da glicose por processo heterofermentativo do *L. fermentum* gera como principal produto o ácido lático (FIGURA 2). O uso do açúcar por essas bactérias influencia negativamente o rendimento na produção do etanol, causando perdas significativas ao processo, pois a presença do ácido lático na fermentação é tóxica às leveduras, inibindo a capacidade reprodutiva de *S. cerevisiae*, diminuindo a viabilidade do fermento e consequentemente a síntese do álcool (NARENDRANATH et al., 1997; THOMAS et al., 2001).

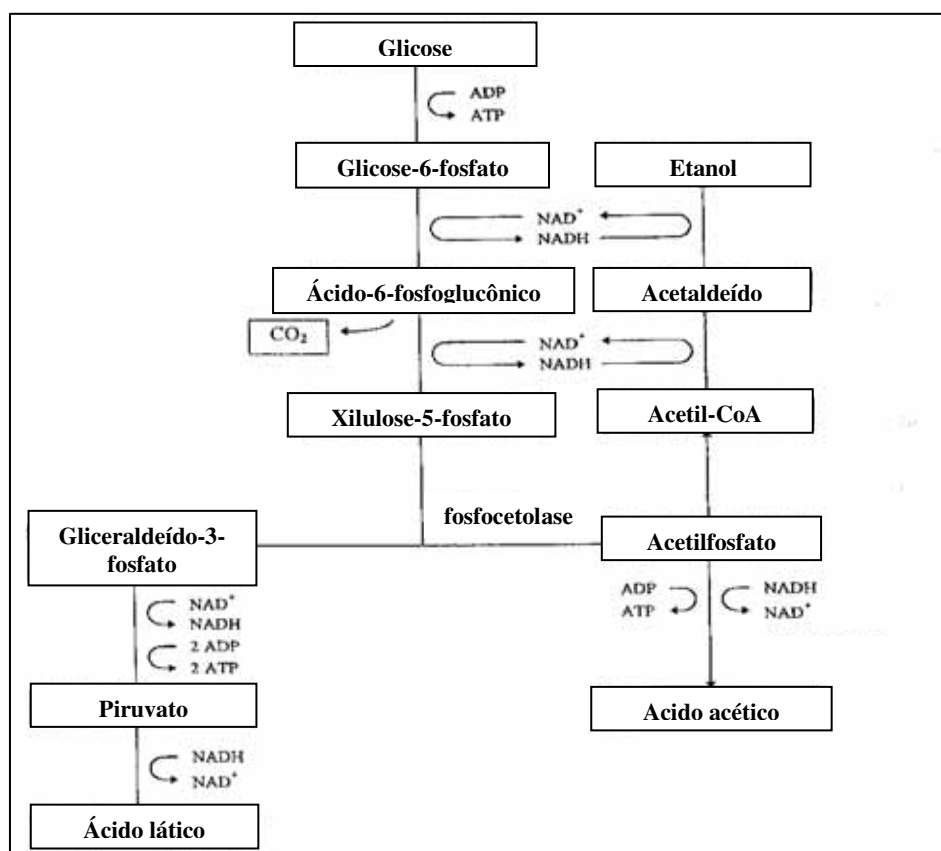


Figura 2. Esquema da produção de ácido lático pelas bactérias heterofermentativas como as do gênero *Lactobacillus* (SALOVAARA, 1998).

O efeito tóxico dos ácidos orgânicos sobre a levedura durante a fermentação depende da concentração e sinergismo com outros compostos e a pressão osmótica do meio (OLIVA-NETO, 1995). O ácido láctico atravessa a membrana plasmática da levedura por difusão passiva. No interior da célula, a forma não dissociada do ácido se ioniza, pois o pH intracelular é em torno de 6,0 a 7,0 e o pKa do ácido láctico é igual a 3,86 causando uma acidificação do citosol. Com esse aumento de íons H^+ no interior da levedura através da bomba de prótons a enzima H^+ -ATPase também aumenta sua atividade para regular o pH interno da célula, resultando gasto da energia necessária para o crescimento e sobrevivência da levedura, com o tempo isso levará a morte celular (HOLYOAK et al., 1996).

Desta forma o controle de bactérias lácticas é muito importante, pois tanto a contaminação quanto a concentração do caldo ao longo do processo acarretam elevados níveis de ácido láctico no mel final. O monitoramento nas diversas etapas da produção do álcool, em pontos estratégicos, pode ser feito pela quantificação de ácido láctico mostrando o grau de contaminação e assim assegurar a qualidade do melaço (VENTURA e ANGELIS 2007).

Gallo (1989) realizou um extenso levantamento da microbiota predominante de amostras de todo o ambiente fermentativo e constatou que 98,52% das bactérias isoladas eram pertencentes ao grupo das Gram +, sendo que a maior parte das bactérias isoladas pertencem ao gênero *Lactobacillus* (59,75%) e neste percentual, predomina a espécie *L. fermentum* com 26,20%. Rosales (1989) em seu trabalho com amostragem das etapas da fermentação detectou 45,04% de bactérias do gênero *Lactobacillus* e 14,41% pertencentes ao gênero *Leuconostoc*. Outro trabalho realizado por Oliva-Neto (1990) com análises do leite de levedura sem tratamento ácido também constatou grande presença das bactérias lácticas: *L. fermentum* (62%), *L. murinus* (9%), *L. vaccinoferus* (9%), *L. plantarum* (2%) e *Leuconostoc* (2%).

O isolamento freqüente de cepas de *L. fermentum* em fermentações floculadas evidenciou sua importância como contaminante de processos industriais. Os *Lactobacillus* apresentam-se na forma de bastonetes, são bactérias caracterizadas como acidófilas por se desenvolverem em ambientes com pH baixo, além disso, são resistentes ao etanol e são microaerófilas, crescendo em baixos níveis de oxigênio.

Estudos realizados por Oliva-Neto (1995) relatam que o aumento de *L. fermentum* durante a fermentação está diretamente relacionado à presença da levedura. Em cultivo puro não ocorre o crescimento da bactéria devido à ausência do extrato de levedura. Os aminoácidos presentes nesse extrato são os principais componentes que estimulam o aumento da população das bactérias lácticas. Quando leucina, isoleucina ou valina não foram adicionados ao meio houve ausência de crescimento do *L. fermentum* (OLIVA-NETO E YOKOYA, 1997). Na concentração de 1% do extrato de levedura, no modelo estudado pelo autor, há uma forte infecção bacteriana, causando a morte da levedura em 3 ciclos fermentativos de 20 horas cada, devido ao excesso de ácido láctico. O autor concluiu que a duração de cada ciclo está relacionada ao desenvolvimento da bactéria. Quanto menor a duração do ciclo, menor o grau de competição das bactérias. Ciclos com duração de 20 horas favorecem as bactérias, o que não ocorre quando a duração é de 12 horas.

Em processo de batelada alimentada com reciclo de células, ainda segundo Oliva-Neto (1990), a influência negativa da acidez provocada por *L. fermentum*, acontece a partir do 8º ciclo, chegando a níveis de 10^9 cel./mL nos ciclos finais. O que causa uma acentuada queda no rendimento fermentativo, chegando a 46,7% (em relação ao teórico) e a produtividade do etanol diminui 53,7% em relação aos ciclos iniciais. Estudos mostraram que a levedura foi fortemente inibida por *L. fermentum* após alguns reciclos. Quando acidez total (principalmente ácido láctico) excedeu 4,8 g/L no caldo houve uma séria interferência na formação de brotos e na viabilidade celular e, acima de 6,0 g/L houve decréscimo no rendimento alcoólico (OLIVA-NETO E YOKOYA, 1994).

Além dos problemas causados pela produção do ácido láctico pela bactéria, outro fator que também afeta a produtividade do etanol nas indústrias alcooleiras é o efeito de floculação causada na levedura *S. cerevisiae* por espécies do gênero *Lactobacillus*.

A floculação causada por *L. fermentum* estaria relacionada com um mecanismo intercelular em nível da parede celular do microrganismo, envolvendo resíduos de aminoácidos da superfície celular da bactéria e carboidratos da parede celular da levedura (BROMBERG, 1994 *apud* OLIVEIRA-FREGUGLIA e HORII, 1998). De acordo com resultados obtidos por Alcarde et al. (2005) o processo de floculação envolvendo compostos protéicos da superfície celular são para as espécies de

L. plantarum, *L. fermentum* e *L. buchnerie*. Para *L. fructivorans* e *L. fructosus*, a presença de outros compostos celulares também pode estar envolvida na floculação. Além dessa interação intercelular também é necessária a presença de íons Ca^{++} que atuam diretamente na floculação (STRATFORD, 1993; LUDWIG, 1998).

O cálcio pode atuar como ponte de ligação entre os grupos negativos das fosfomananas da parede celular da levedura e os receptores protéicos das células bacterianas. Sabe-se que a ligação destas células ocorre devido a formação destas pontes. E que níveis de pH acima de 3,0 também favorecem estas ligações. Pois, quando em níveis abaixo desse valor, a quantidade de íons H^+ no meio é alta, concorrendo com os íons de Ca^{++} . Por isso o tratamento com ácido sulfúrico na indústria para desflocular a levedura auxilia no processo de fermentação com reciclo de células (LUDWIG et al., 2001).

Embora seja comprovada a ação floculante do *L. fermentum* sobre a levedura é necessário que haja certo nível de contaminação, atingindo o valor crítico com relação ao número de células de leveduras, ou seja, uma razão de 5:1 célula de bactéria/célula de levedura (GARCIA, 1999).

Tanto a floculação como a toxidade do ácido láctico diminuem a viabilidade celular de *S. cerevisiae* e com a lise das células da levedura há liberação de mais compostos vitais para as bactérias favorecendo a população bacteriana e aumentando o grau de contaminação.

3.5. Agentes antimicrobianos

Com frequência ocorrem contaminações nas dornas que afetam os processos fermentativos etanólicos. O controle desses contaminantes leva pesquisadores a constantes estudos a fim de encontrarem métodos cada vez mais eficazes na solução deste problema.

Medidas preventivas visam diminuir a contaminação das dornas como: limpeza das moendas, das tubulações, instalações da fermentação, descarte do fundo de dorna, returbinação do fermento, tratamento ácido, e outros, em geral não são suficientes. Em alguns casos não resta alternativa senão o uso de antibióticos e/ou biocidas (GUERRA, 1995).

O uso de antimicrobianos está intimamente ligado às condições de cada dorna, por isso é importante que as dosagens e técnicas de uso sejam estabelecidas por cada laboratório nas indústrias alcooleiras. A dificuldade de encontrar um biocida que seja eficiente está no fato de haver populações de microrganismos diferentes nas dornas, onde uma é a responsável pela fermentação e não deve ser afetada e outra as populações contaminantes que devem ser eliminadas.

Alguns desses contaminantes podem ser causadores da floculação, que dificulta o contato entre o antimicrobiano usado no processo e a bactéria causando o aumento dessa população, que provocam um aumento de acidez, afetando a qualidade do etanol produzido, seja como combustível ou para a indústria de bebidas alcoólicas (LUDWIG et al., 2001).

Stupiello (1993) com fez um levantamento dos agentes antimicrobianos mais usados e seu modo de ação sobre bactérias gram (+). Os biocidas químicos relatados foram: fenol e compostos fenólicos, álcoois, halogênicos e halogenados, metais pesados e seus compostos, corantes, detergentes, composto de amônia quaternária, aldeídos e agentes gasosos. Os antibióticos mais usados nos processo fermentativos são tetraciclina, cloranfenicol, penicilina e virginiamicina.

O modo de ação de alguns destes compostos, segundo a autora, são:

- Compostos fenólicos: quando em altas concentrações agem na parede celular, rompendo-a e precipitando o conteúdo protoplasmático. Quando em concentrações baixas promovem a inativação de enzimas essenciais para a manutenção da célula.
- Compostos clorados: há muitas teorias sobre o modo de ação desse composto, citado em diversas literaturas, mas todas concordam que a ação desses compostos é rápida ocorrendo logo após a adição ao meio. Dentre algumas das teorias destacam-se: (a) combinação do oxigênio com componentes do protoplasma celular destruindo o microrganismo; (b) combinação do cloro com proteínas da membrana celular formando N-cloro, interferindo no metabolismo celular e levando o microrganismo à morte; (c) o cloro consegue modificar a membrana celular permitindo a difusão do conteúdo interno da célula para o meio externo; (d) inibição de enzimas importantes nas reações celulares.

- Quaternário de amônio: desnatura as proteínas do microrganismo, interfere na glicólise e causa danos na membrana celular.
- Aldeídos: Normalmente utilizados na forma de glutaraldeído e formaldeído. Este último está relacionado ao bloqueio de funções específicas da célula, como síntese de parede celular, ou pelo acúmulo de substância celular, que inibe a formação de metionina, que tem função vital para a célula. Por outro lado, o glutaraldeído atua nas proteínas superficiais das células.
- Antibióticos: obtidos a partir do metabolismo de microrganismos vivos, agem como inibidores de outros microrganismos e podem ser divididos quanto ao mecanismo de ação, como por exemplo: inibição de cofatores enzimáticos (tetraciclina); síntese protéica (cloranfenicol e virginiamicina); inibição da síntese de constituintes da parede celular (penicilina).

Além dos biocidas acima, hoje é frequente o uso do ácido sulfúrico combinado com outros antimicrobianos, pois o tratamento ácido somente, em alguns casos, não é suficiente para conter a contaminação (BRAUNBECK, 1988). O ácido ajuda principalmente no combate a floculação de *S. cerevisiae*, causada por contaminantes com poder floculante. Isso ocorre em função do pH, a faixa que na indústria é feito o tratamento do fermento é 2,0 – 3,0, evitando que ocorra a formação de flocos, porém o uso contínuo pode diminuir a viabilidade celular da levedura. O tempo de permanência do fermento no ácido durante o tratamento varia entre 0,5 a 2 horas. Quanto maior o tempo de exposição e menor o pH, maior será o impacto prejudicial ao metabolismo da levedura (LUDWIG, 1998).

No entanto ao invés de uso individual a combinação de antimicrobianos, em especial com ácido sulfúrico pode apresentar melhores resultados na desinfecção e controle de contaminantes, assegurando maior produtividade do sistema (PULZ, 2002).

O desenvolvimento de novas tecnologias e produtos para combater os contaminantes e evitar a floculação, terá grande auxílio na produção de etanol nas indústrias sucro-alcooleiras do país.

3.6. Óleo de rícino

O óleo de rícino é extraído das sementes da mamona, uma planta da família das *Euforbiáceas*, sub-família *Crotonoideae*, tribo *Acalypheae*, subtribo *Ricinae* e gênero *Ricinus* do qual existe apenas a espécie *communis* (CHIERICE e CLARO NETO, 2001). A provável origem desta planta é que tenha vindo da Ásia e África. Há relatos de que a mamona tenha sido trazido para o Brasil pelos portugueses. Hoje está dispersa por todo país, principalmente no nordeste.

Segundo Oliveira (2004), pesquisador da Embrapa Algodão, a Bahia é o maior produtor nacional de mamona, com 92% da produção brasileira, concentrada fundamentalmente na região de Irecê. Hoje o Brasil tem cerca de cinco milhões de hectares zoneados agro ecologicamente para o cultivo dessa oleaginosa. Apenas na região Nordeste são cerca de 19 milhões de hectares úteis a agricultura de regime de sequeiro para todas as culturas, dos quais cerca de 4,5 milhões com aptidão para o cultivo da mamona em condições de sequeiro. O uso de sementes certificadas tem possibilitado uma produtividade de até 5,5 toneladas por hectare na Bahia.

O óleo de mamona é conhecido também como óleo de rícino e “castor oil”, é o mais importante constituinte da semente da mamona, sendo o ácido ricinoléico (FIGURA 3), que se apresenta em maior porcentagem, 89,5%, os quase 10% restantes constituídos de ácidos graxos não hidroxilados (CHIERICE E CLARO NETO, 2001), isso é o que diferencia o óleo da mamona das demais oleaginosas. O teor de óleo das sementes varia de 35% a 55%, cujo padrão comercial é de 45% (OSAVA, 2003).

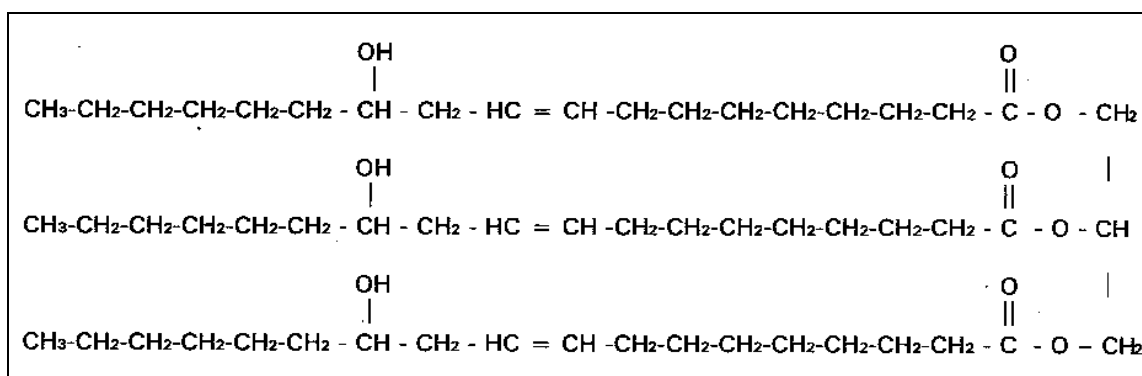


Figura 3. Estrutura do triglicerídeo: ácido ricinoléico, o principal componente do óleo de rícino.

O óleo de mamona apresenta enorme versatilidade química possibilitando sua aplicação em diversas áreas industriais como: cosméticos, medicinal, lubrificantes, polímeros, além de poder ser um substituto do petróleo na síntese de vários produtos.

Segundo Chierice e Claro-Neto (2001), o processo industrial para obtenção dos ésteres derivados do óleo de mamona, com reação na carbonila, pode ser feito por:

- transesterificação direta do óleo com álcoois de interesse;
- pré-transesterificação com metanol ou etanol e posterior transesterificação com glicóis;
- alcoólise parcial, muito utilizada para obtenção de mono e diglicerídeos do ácido ricinoléico;
- esterificação do ácido ricinoléico.

3.6.1. Ação antimicrobiana de derivados do óleo de rícino

O óleo de mamona é um éster de álcool polihídrico, basicamente tri-ricinoleato de glicerina, que apresenta um grupo hidroxila no carbono 12 da cadeia de átomos de carbono do ácido ricinoléico. Desta forma, pode originar diversos tipos de ésteres, como ésteres primários, secundários, duplos, inter-ésteres, mono e diglicerídeos (OLIVEIRA, 2005).

Alguns estudos feitos com a mistura de alguns destes ésteres, comprovaram a capacidade antimicrobiana de derivados do óleo de mamona. Existem produtos à base desses ésteres registrados para venda, como o Endoquil® e o Poliquil®, da empresa Poliquil Araraquara Polímeros Químicos Ltda.

Dentre os estudos com ésteres derivados do óleo de mamona a maioria inclui os da área de endodontia, onde são usados como antimicrobianos nas soluções irrigadoras em tratamentos de canais, assepsia no campo operatório, entre outras.

Os ésteres derivados do óleo apresentam atividade bacteriostática, inibindo a viabilidade dos microrganismos testados. Ferreira et al., (2002) estudaram a ação desses ésteres sobre bactérias anaeróbias estritas, comparando com outros antibacterianos usados na endodontia. O detergente apresentou eficácia semelhante àquela obtida com os demais produtos. Leonardo et al., (2001) verificaram a atividade antimicrobiana *in*

vitro de uma solução irrigadora derivada do óleo de mamona, para tratamento odontológico.

Outro trabalho também comprovou a ação do detergente de óleo de mamona em tecidos dentários com grave infecção microbiana (FERREIRA et al., 1999 a). Diante de outro estudo verificou-se que a solução do derivado a 3,3% e solução de hipoclorito de sódio a 0,5% apresentaram atividade antimicrobiana semelhante, mostrando a capacidade desinfetante do produto (FERREIRA, 1999 b).

SIQUEIRA (2005) comparou *in vivo*, o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio a 1%, da clorexidina a 2% e do detergente derivado do óleo de mamona a 10% (Endoquil) na irrigação de canais radiculares de 18 dentes anteriores superiores humanos com necrose pulpar e lesão periapical e constatou no teste de anaerobiose que a clorexidina a 2% e o detergente derivado do óleo de mamona a 10% foram significativamente melhores que o hipoclorito de sódio a 1% quanto à presença bacteriana.

Outros estudos objetivando verificar a ação antifúngica sobre *Candida albicans* (BERTOLETTI et al., 2004) e antibacteriana sobre *Escherichia coli* (MESSETTI et al., 2005), evidenciaram a capacidade antimicrobiana do Poliquilgerm®.

Messetti et al., (2007) verificaram a atividade do Poliquilgerm® sobre *Leuconostoc mesenteroides*, que quando foi adicionado à cultura da bactéria mostrou importante diminuição da viscosidade do meio, indicando que há a possibilidade de um bloqueio na síntese de dextrana sacarase ou inibição do crescimento do microrganismo. Bertoletti et al., (2007a) constatarem efeito microbiostático em *S. cerevisiae* e microbicida em *L. fermentum*. Em outro estudo Bertoletti et al. (2007b) mostraram que na presença do biocida houve uma diminuição na produção de ácido lático em até 90%. Estes trabalhos indicaram que o Poliquilgerm® tem potencial para ser usado no controle de contaminantes nas dornas de fermentação.

4. MATERIAL E MÉTODO

O trabalho foi desenvolvido no Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Rio Claro.

4.1. Materiais

4.1.1. Microrganismos:

Para a realização dos ensaios foram utilizadas as seguintes culturas:

- *Saccharomyces cerevisiae*, isolado das dornas de fermentação de destilaria da região.
- *Lactobacillus fermentum* FT 405-B, da Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas/SP, Brasil.
- “Pool” de bactérias contaminantes de fermentação formado por 5 isolados:
 - LF - *L. fermentum* FT 405-B
 - BB – isolada de dorna durante processo de fermentação
 - V5 – isolada do vinho durante processo de fermentação
 - V6 – isolada do vinho durante processo de fermentação

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo do meio caldo de cana suplementado com nutrientes (CSN)

Para cada 1000 mL de caldo de cana-de-açúcar fresco acrescentaram-se duas claras de ovos batidas em neve. Após homogeneização foi submetido a vapor fluente em autoclave por 30 minutos. Depois de resfriado, filtrou-se o caldo com auxílio de algodão e gaze em funil de vidro (FALCÃO DE MORAIS et al., 1983). O caldo foi armazenado em freezer até sua utilização.

Para a realização dos experimentos o caldo de cana clarificado foi diluído com água destilada até os graus Brix desejado e em seguida foi suplementado com 0,5% de peptona e 0,5% de extrato de levedura. O meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos à 121°C.

4.2.2. Manutenção das culturas

As culturas foram repicadas semanalmente seguindo o procedimento descrito abaixo para cada microrganismo. Cada cultura foi ainda mantida sob refrigeração de – 15°C nos respectivos meio e glicerol 10%, na proporção 1:1.

- *S. cerevisiae* preservado em meio Sabouraud e CSN líquido esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após inoculação a cultura foi incubada a 28°C por 48 horas. Em seguida mantida sob refrigeração a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ até o próximo repique.
- *L. fermentum* preservado em meio MRS e CSN líquido esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após inoculação a cultura foi incubada a 35°C por 48 horas. Em seguida mantida sob refrigeração a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ até o próximo repique.
- “Pool” de bactérias preservado em meio MRS e CSN líquido esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após inoculação a cultura foi incubada a 35°C por 48 horas. Em seguida mantida sob refrigeração a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ até o próximo repique.

4.2.3. Cultivo dos Microrganismos para os ensaios

Durante os testes, as culturas da levedura e das bactérias foram ativadas por inoculação duas ou três vezes consecutivas, conforme crescimento da cultura, com intervalos de 24 horas, utilizando o último repique para realização dos ensaios. Os repiques foram realizados respeitando meio de cultivo, temperatura e as condições segundo o teste que seria realizado.

4.2.4. Obtenção da cultura mista

O procedimento para se obter a cultura mista foi feito a partir das culturas puras de *S. cerevisiae* e de cada uma das bactérias contaminantes, que em seguida foram repicadas em tubos contendo 10 mL de meio CSN 10°Brix.

O “pool” de bactérias foi obtido previamente, efetuando-se uma mistura com 0,2 mL de cada um dos inóculos em um tubo contendo 10 mL de CSN 10°Brix, incubadas a 30°C por 24h. Transcorrido esse tempo, em outro tubo também contendo 10mL do mesmo meio, inoculou-se 2 mL do “pool” e mais 2 mL de *S. cerevisiae* obtendo assim a cultura mista destes microrganismos, que também foi incubada a 30°C, por 24h (FIGURA 4).

Quando no experimento utilizou-se a cultura mista de *S. cerevisiae* apenas com o *L. fermentum*, inoculou-se 2 mL de cada isolado em um tubo contendo 10 mL de meio CSN a 10 °Brix e incubou-se a 30°C, por 24h.

Após a obtenção das culturas mistas, os testes foram realizados seguindo o protocolo conforme cada tratamento dos ensaios realizados.

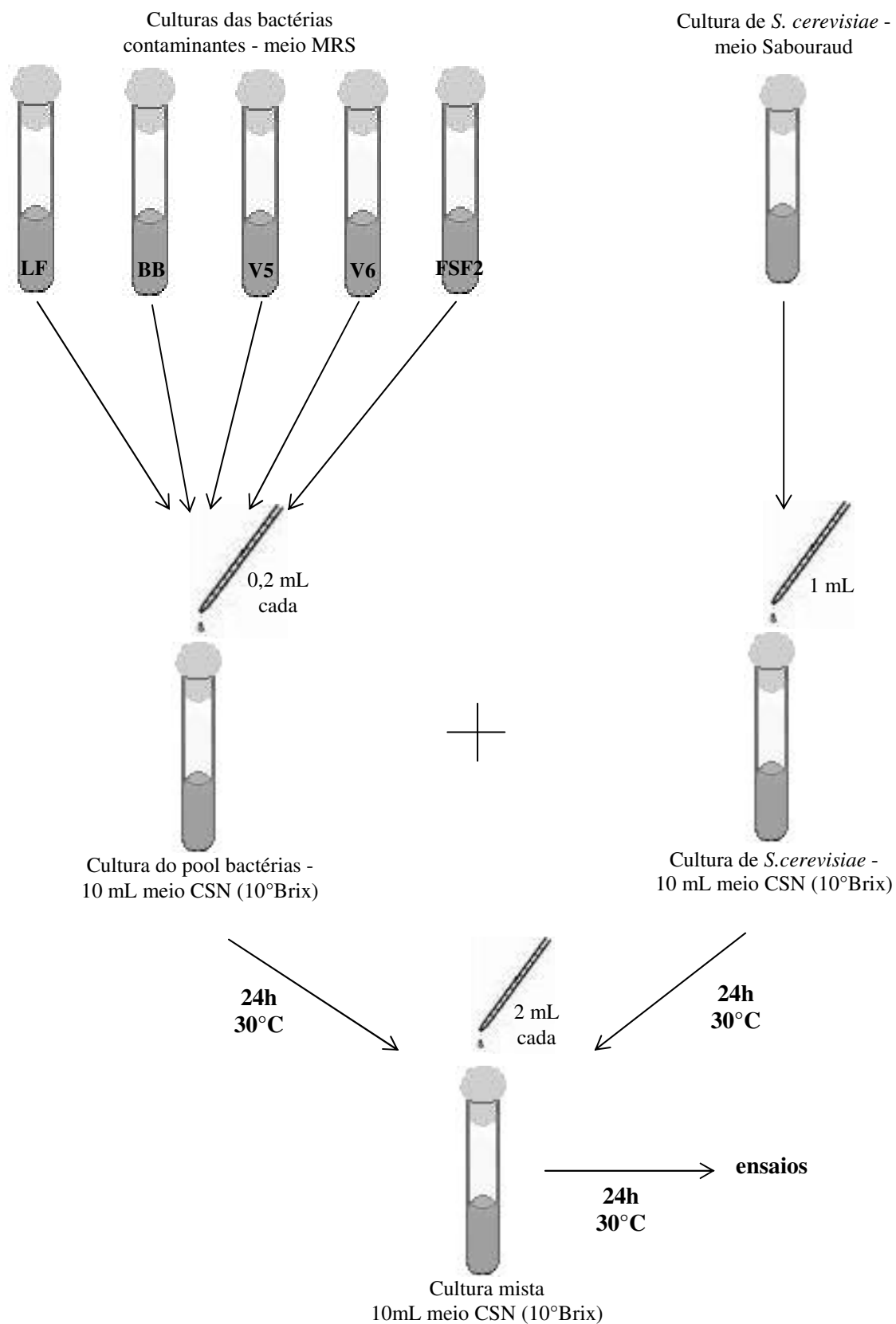


Figura 4. Esquema para obter a cultura mista de *Saccharomyces cerevisiae* e “pool” de bactérias.

4.3. Experimentos

4.3.1. Ensaio da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes concentrações de Poliquilgerm®

O inóculo *S. cerevisiae* foi inoculado em meio Sabouraud contendo as concentrações de Poliquilgerm® estudadas: 0; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 e 200ppm, conforme o protocolo apresentado na TABELA 1.

A viabilidade das culturas foi avaliada nos tempos: 0; 24; 48 e 72 horas. Para isto, retirou-se 1mL de amostra de cada tratamento e em um tubo de cultivo adicionou-se o corante eritrosina na mesma proporção (1:1). De cada um dos tubos contendo a diluição retirou-se uma alíquota para contagem em câmara de Neubauer. E pela técnica de coloração diferencial com o corante eritrosina quantificou-se as células e brotos vivos e mortos (FIGURA 5).

Os resultados foram expressos em porcentagem, sendo que a viabilidade da cultura de *S. cerevisiae* representa a relação entre células vivas e o total de células. O brotamento corresponde entre a relação número de brotos vivos e total de células. E a viabilidade dos brotos a relação de brotos vivos e total de brotos. Os modelos para os cálculos seguem abaixo:

$$\text{viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{cel. vivas}}{\text{cel. vivas} + \text{cel. mortas}} \times 100$$

$$\text{taxa brotamento (\%)} = \frac{\text{brotos vivos}}{\text{cel. vivas} + \text{cel. mortas}} \times 100$$

$$\text{viabilidade brotos (\%)} = \frac{\text{brotos vivos}}{\text{br. vivos} + \text{br. mortos}} \times 100$$

Considerando que o volume da área de contagem na câmara de Neubauer utilizada é $0,0001\text{cm}^3$, ou seja, 1×10^4 e o total de quadrados é 25, número de células e flocos por mL foi estabelecido por:

$$\text{População} = \frac{\text{células}}{\text{total quadrados contados}} \times 25 \times \text{diluição} \times 10^4$$

$$\text{num. de flocos / mL} = \frac{\text{num. flocos}}{\text{total quadrados contados}} \times 25 \times \text{diluição} \times 10^4$$

Foram realizados 5 repetições e cada condição em triplicata. Desta forma para analisar os parâmetros da viabilidade celular, taxa de brotamento e viabilidade de brotos em relação ao tempo de contato com o Poliquilgerm[®], usou-se um modelo do tipo fatorial considerando como fatores de variação 4 tempos (0; 24; 48 e 72h) e 8 concentrações (0; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 e 200ppm). As análises foram realizadas utilizando o procedimento da análise da variância fatorial, realizado no procedimento GLM do sistema estatístico SAS (Statistical Analysis System) versão 9.12. Como os resultados da análise de variância apresentaram diferença significativa entre a interação tempo X concentração aplicou-se o teste de Tukey.

Tabela. 1. Protocolo experimental dos tratamentos com Poliqualgerm® (ppm) para verificar a viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* em meio Sabouraud líquido, incubada a 28°C, nos tempos estudados (0; 24; 48 e 72h)

Volume (mL)	Concentração de Poliqualgerm® (ppm)							
	0	0,5	1	5	10	50	100	200
Meio de Sabouraud	48,00	48,00	48,00	48,00	8,00	8,00	8,00	7,90
Água destilada	1,0	0,975	0,95	0,75	1,80	1,40	0,90	0,00
Poliqualgerm®	0,00	0,025	0,05	0,25	0,10	0,50	1,00	2,00
Suspensão de <i>S. cerevisiae</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	0,10	0,10	0,10	0,10
Total da suspensão	50,00	50,00	50,00	50,00	10,00	10,00	10,00	10,00

OBS.: Os volumes finais foram diferentes em função dos volumes/concentrações do Poliqualgerm®

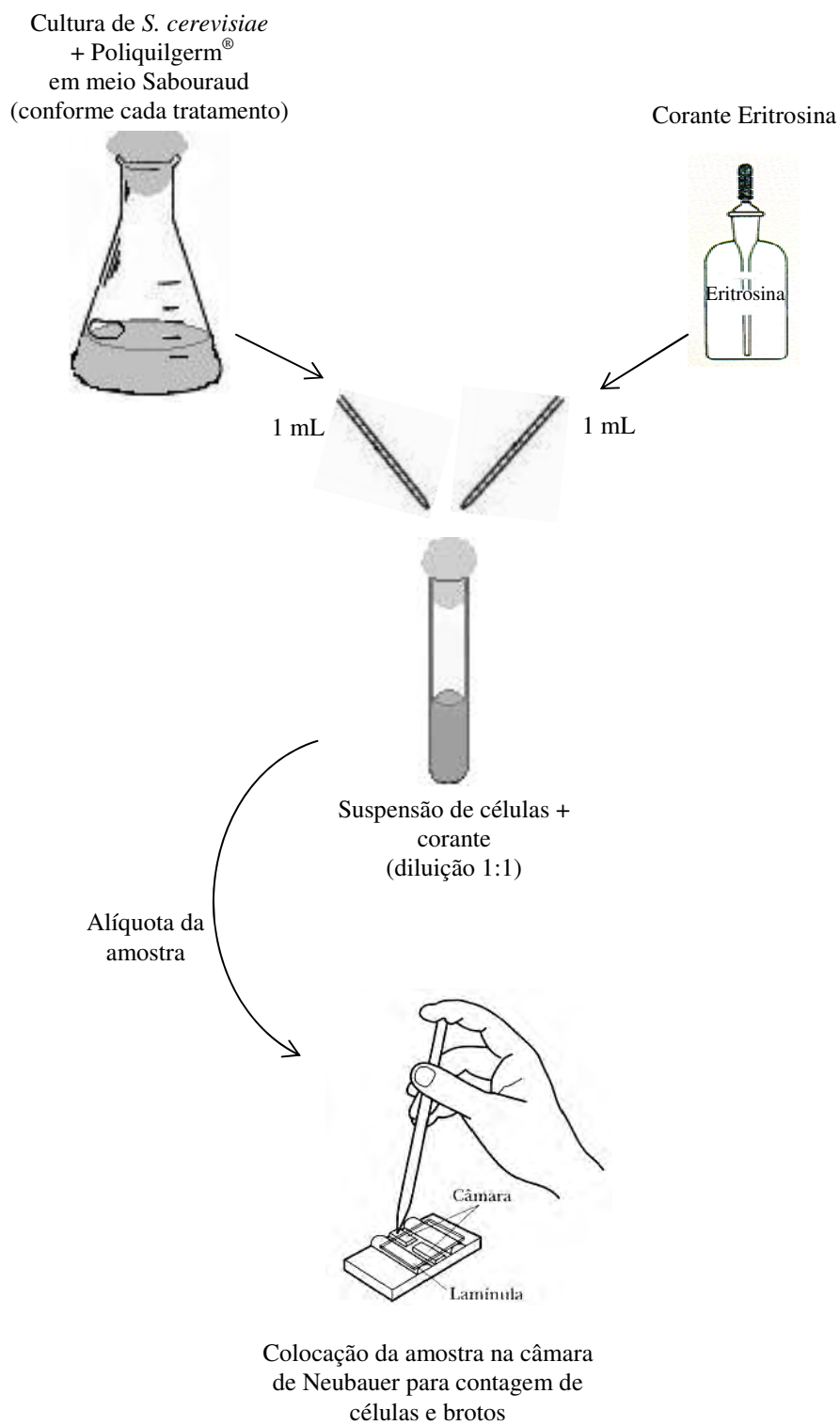


Figura 5. Esquema do ensaio de quantificação para porcentagem da viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae*.

4.3.2. Concentração inibitória mínima (CIM) do *Lactobacillus fermentum* frente ao Poliquilgerm®

Da cultura estoque foram efetuados três repiques consecutivos para ativação da mesma, com intervalos de 24h cada, em meio MRS líquido e incubados a 35°C. Do terceiro repique foi realizado o experimento. As culturas foram previamente padronizadas quanto à quantidade de UFC/mL, mediante a técnica de plaqueamento “Pour Plate”.

Para determinação da concentração inibitória mínima inoculou-se 0,1mL da cultura de *L. fermentum* em tubos de cultura contendo meio MRS líquido e Poliquilgerm® nas concentrações estudadas: 0; 10; 50; 100 e 200 ppm, obtendo-se um total de 5mL, conforme protocolo descrito na TABELA 2.

Decorrido cada tempo de contato estudado: 0; 24; 48 e 72 horas, as culturas foram avaliadas mediante a técnica de plaqueamento “Pour Plate”, seguindo a diluição necessária para a contagem, previamente determinada entre 10^{-7} e 10^{-8} . As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C procedendo-se a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e, após 48 horas de incubação procedeu-se nova contagem.

Quando os tratamentos não apresentaram formação de colônias nas placas foram submetidos à técnica da reversão das culturas. Este método foi usado para verificar a eficiência do biocida e a viabilidade ou não de *L. fermentum*. A técnica consiste na visualização dos tubos quanto à turbidez do meio, considerando que o meio turvo apresentou crescimento e o meio translúcido não, utilizando como controle um tubo contendo somente o meio sem o inóculo. Para este procedimento inoculou-se 0,1mL da suspensão e em tubos contendo 3mL de meio MRS sem o Poliquilgerm®, incubados a 35°C e avaliados após 24 e 48 horas. O esquema deste experimento está representado na FIGURA 6.

O experimento totalizou cinco repetições em triplicata de cada uma delas. Para analisar os dados do comportamento de *L. fermentum* frente ao Poliquilgerm®, usou-se um modelo do tipo fatorial considerando como fatores de variação 4 tempos de contato (0; 24; 48 e 72h) e 5 concentrações do biocida (0; 10; 50; 100 e 200 ppm). As análises foram realizadas utilizando o procedimento da análise da variância fatorial, realizado no procedimento GLM do sistema estatístico SAS (Statistical Analysis System) versão

9.12. Como os resultados da análise de variância apresentaram diferença significativa entre a interação tempo X concentração aplicou-se o teste de Tukey. E os dados da reversão das culturas foram apresentados em tabela.

Tabela 2. Protocolo dos tratamentos com Poliquilgerm® (ppm) para verificar a concentração mínima inibitória de *Lactobacillus fermentum*, em meio MRS líquido, incubado a 35°C, nos tempos estudados (0; 24; 48 e 72h)

Volume (mL)	Concentração de Poliquilgerm® (ppm)				
	0	10	50	100	200
Meio de MRS	4,00	4,00	4,00	4,00	3,90
Água destilada	0,90	0,85	0,65	0,40	0,00
Poliquilgerm®	0,00	0,05	0,25	0,50	1,00
Susp. de <i>L. fermentum</i>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Total da suspensão	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

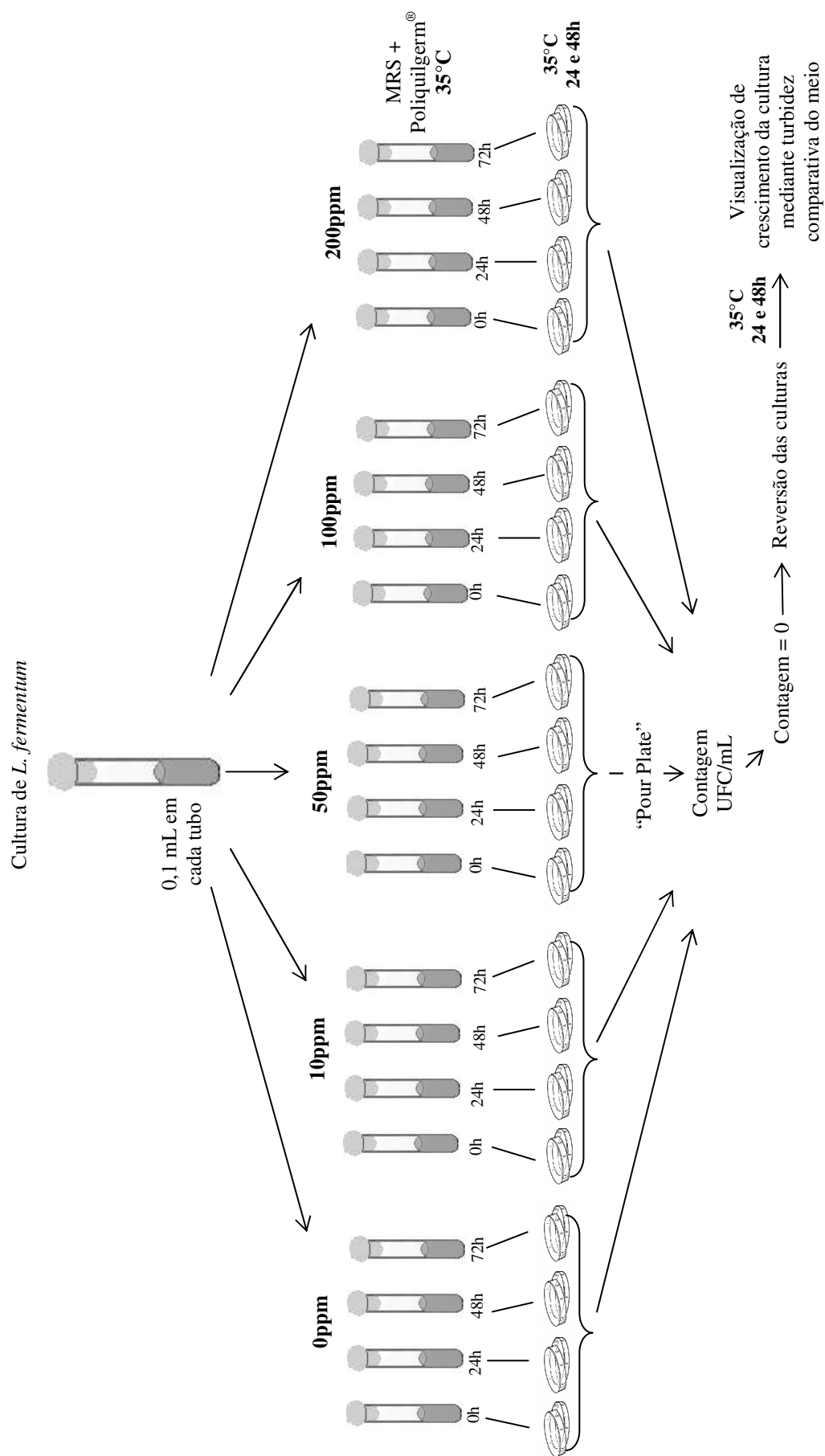


Figura 6. Esquema do ensaio de concentração inibitória mínima (MIC) do *Lactobacillus fermentum*.

4.3.3. Verificação do desempenho do Poliquilgerm® quanto à inibição na produção de ácido láctico por *Lactobacillus fermentum* e “pool” de bactérias

Neste experimento acompanhou-se a produção de ácido láctico pelas bactérias em presença do Poliquilgerm®, nas concentrações estudadas: 0; 0,5; 1; 5; 10; 20 ppm.

As culturas utilizadas no teste foram: *S. cerevisiae*; *L. fermentum*; “pool” de bactérias; associação de *S. cerevisiae* + *L. fermentum* e de *S. cerevisiae* + “pool” de bactérias.

Para obtenção dos inóculos, as culturas foram ativadas com dois repiques consecutivos em intervalos de 24 horas, no meio CSN a 10°Brix. Em cada condição experimental foi feita previamente a contagem inicial de UFC/mL para determinar o número de células, mediante a técnica de plaqueamento “Pour Plate”.

Inoculou-se a seguir 0,1mL de cada uma dessas culturas em tubos contendo meio CSN a 10°Brix e Poliquilgerm® conforme protocolo apresentado na TABELA 3. Transcorrido o tempo de contato de 24 horas, analisou-se o efeito em cada tratamento, mediante dosagem de ácido láctico em lactímetro YSI 1500 Sport Analyser (Yellow Springs Inc., Ohio-USA). Após calibração do aparelho, retirou-se uma alíquota de 25µL de cada amostra, injetando no equipamento, que apresentou o resultado em mmol/L de ácido láctico (FIGURA 7).

Verificou-se ainda a viabilidade da levedura mediante o teste de fermentação com tubos de Dühran. Onde a formação de bolhas de gás nos tubos indicou a atividade do processo fermentativo durante os tratamentos, que foram acompanhados após 24 e 48 horas de incubação.

Este experimento totalizou quatro repetições em triplicata de cada um dos tratamentos e para analisar o desempenho do Poliquilgerm® frente ao *L. fermentum* e “pool” de bactérias contaminantes, quanto à produção do ácido láctico, aplicou-se um modelo do tipo fatorial considerando como fatores de variação 5 culturas (*S.cerevisiae* *L.fermentum*; *L.fermentum* + *S.cerevisiae* “pool” bactérias; “pool” de bactérias + *S.cerevisiae*) e 6 concentrações do biocida (0; 0,5; 1; 5; 10; 20 ppm). Utilizou-se a análise de variância fatorial, realizado no procedimento GLM do sistema estatístico SAS (Statistical Analysis System) versão 9.12. Como os resultados da análise de variância apresentaram diferença significativa entre a interação cultura X concentração

aplicou-se o teste de Tukey. Os dados do teste de fermentação em tubos de Durhan foram expressos em forma de tabela.

Tabela 3. Protocolo para quantificação do ácido láctico nos tratamentos com do Poliquilgerm[®] (ppm) sobre *Lactobacillus fermentum* e “pool” de bactérias em meio CSN líquido 10°Brix, incubados a 30°C, por 24h

Volume (mL)	Concentração de Poliquilgerm [®] (ppm)					
	0	0,5	1	5	10	20
Meio de CNS	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00
Água destilada	0,90	0,895	0,89	0,85	0,80	0,70
Poliquilgerm [®]	0,00	0,005	0,01	0,05	0,10	0,20
Suspensão do inóculo	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Total da suspensão	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00

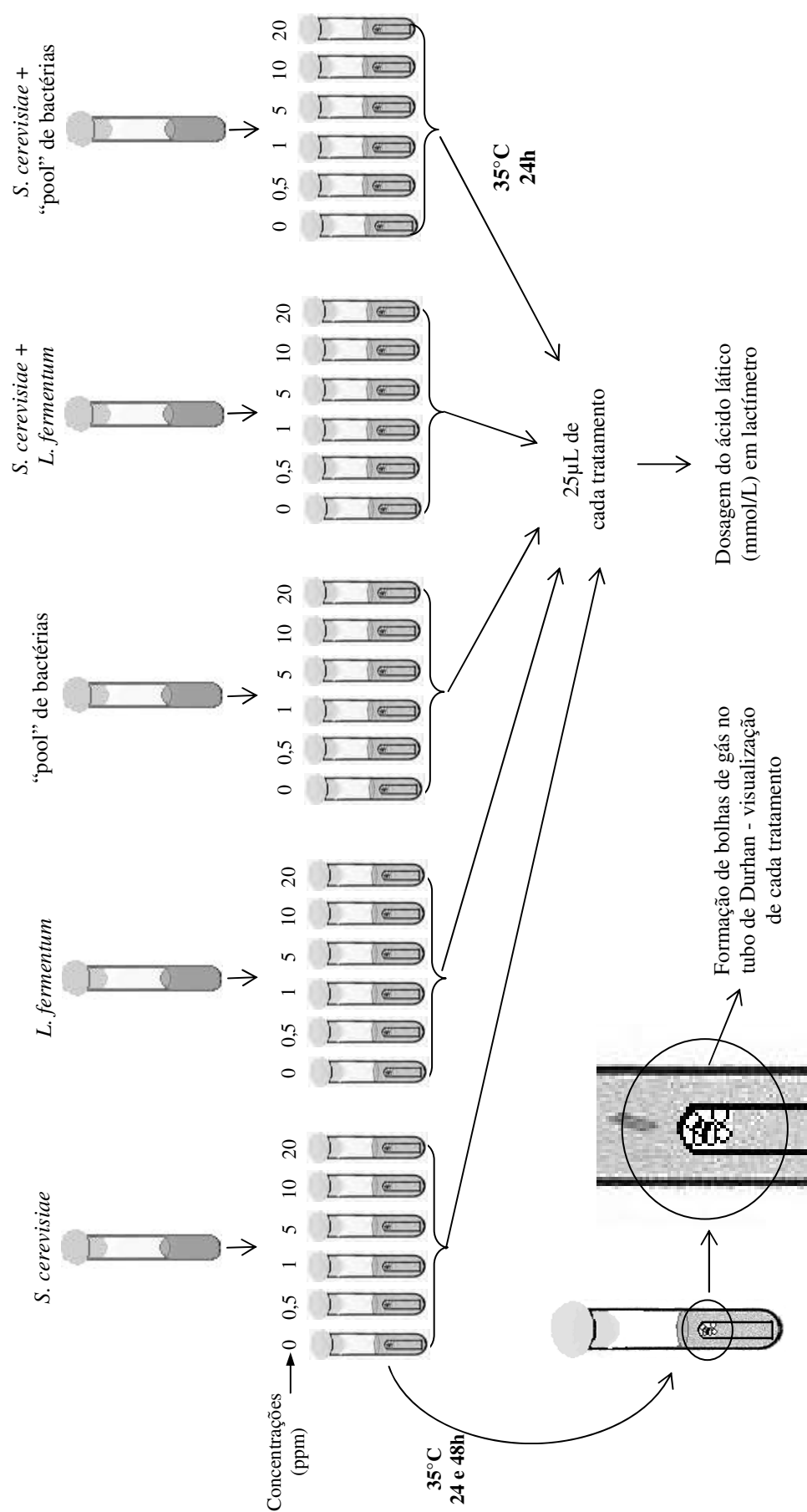


Figura 7. Esquema do ensaio para dosagem de ácido láctico produzido.

4.3.4. Ação do Poliquilgerm® na fermentação com cultura de *Saccharomyces cerevisiae* pura e em presença de bactérias contaminantes

Para a realização deste experimento utilizaram-se as culturas de *S.cerevisiae* e “pool” de bactérias e a associação destas duas culturas, cultivadas em meio CSN a 10°Brix. As concentrações estudadas para verificar a ação do Poliquilgerm® sobre a fermentação foram: 0; 1; 5; 10 e 20 ppm, seguindo o protocolo demonstrado na TABELA 4.

O tempo de fermentação foi determinado até que o açúcar fosse degradado chegando a aproximadamente 3°Brix de concentração no controle da cultura pura de *S. cerevisiae*. Este parâmetro foi atingido após 13 horas de cultivo a 30°C e sob agitação de 100rpm em shaker.

Durante o tempo de fermentação verificou-se também os parâmetros descritos abaixo:

- Quantidade e viabilidade inicial dos inóculos de *S. cerevisiae* e “pool” de bactérias
- °Brix e pH
- Teor alcoólico
- Dosagem do açúcar redutor total (MILLER, 1959)

Os dados foram obtidos por 8 repetições de cada tratamento. Para analisar a ação do Poliquilgerm® durante a fermentação aplicou-se um modelo do tipo fatorial considerando como fatores de variação 3 culturas (*S.cerevisiae*; *S.cerevisiae* + “pool” e “pool” bactérias) e 5 concentrações do biocida (0; 1; 5; 10; 20 ppm). As análises foram realizadas utilizando a análise da variância fatorial, realizado no procedimento GLM do sistema estatístico SAS (Statistical Analysis System) versão 9.12. Como os resultados da análise de variância apresentaram diferença significativa entre a interação tempo X concentração aplicou-se o teste de Tukey. Os dados do consumo do açúcar expresso em °Brix e o ART foram mostrados graficamente. E os dados da avaliação dos níveis de pH foram apresentados em tabela.

Tabela 4. Tratamentos com Poliquilgerm® (ppm) sobre a fermentação com cultura de *Saccharomyces cerevisiae* pura e em presença de bactérias contaminantes em meio CSN líquido 10°Brix, cultivado em erlenmeyer a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e sob agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$

Volume (mL)	Concentração de Poliquilgerm® (ppm)				
	0	1	5	10	20
Meio de CSN	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0
Água destilada	5,0	4,9	4,5	4,0	3,0
Poliquilgerm®	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0
Suspensão do inóculo	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Total da suspensão	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Determinação da quantidade e viabilidade inicial dos inóculos de *S. cerevisiae* e pool de bactérias

As células da levedura foram quantificadas em câmara de Neubauer pela coloração diferencial com o corante eritrosina (na proporção 1:1), das células e brotos vivos e mortos, verificando-se assim a viabilidade da cultura e garantindo um nível de 10^8 células de levedura por mL. A contagem foi realizada em duplicata de cada repetição do processo fermentativo.

As suspensões de bactérias foram diluídas convenientemente e quantificadas mediante o método de plaqueamento pela técnica de “Pour Plate”. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas a 35°C procedendo-se a contagem de UFC/mL em contador de colônias. Este procedimento também foi realizado em duplicata de cada repetição do processo fermentativo.

Avaliação do °Brix e pH

Esses dois parâmetros foram avaliados durante toda fermentação retirando-se uma alíquota de cada tratamento nos tempos: 0; 3; 6; 8; 10 e 13 horas, através de pHmetro e refratômetro digital com correção de temperatura, verificando assim o consumo do açúcar e alterações nos níveis de pH.

Avaliação do teor alcoólico

Transcorrido o tempo de fermentação (13 horas), os erlenmeyers com os tratamentos foram armazenados sob refrigeração (5 a 8°C) para análise do teor alcoólico, que foi avaliado utilizando um ebuliômetro de Salleron.

Análise de açúcares redutores totais (ART)

Para determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART) o meio CSN sem inóculo foi usado como controle para determinar a quantidade inicial de açúcares e avaliou-se uma amostra de cada tratamento após as 13 horas de fermentação. Para isso utilizou-se o método de redução do ácido dinitrossalicílico (ADNS) descrito por Miller (1959). Empregou-se a glicose como padrão e como o meio utilizado foi de caldo de cana foi necessário fazer a inversão da sacarose através da hidrólise ácida, misturando 1mL de cada amostra com 1mL de HCl 2N levando-as em banho-maria para aquecimento por 30 min. a 80°C. Após o resfriamento adicionou-se 1mL de NaOH 2N para neutralização da solução. Em seguida as amostras foram convenientemente diluídas e analisadas com o reagente de ADNS com leitura a 540nm por espectrofotometria ótica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes concentrações de Poliquilgerm®

No teste de viabilidade da levedura, após serem avaliadas as médias das repetições e comparados os resultados das contagens entre controle (meio sem o produto) e os tratamentos (meio com Poliquilgerm®), verificou-se o efeito na viabilidade de células e brotos de *Saccharomyces cerevisiae*.

O estudo mostrou que na concentração de 200 ppm do produto a inibição no crescimento da cultura de *S. cerevisiae* atingiu cerca de 90%. Porém o mesmo não aconteceu em 10; 50 e 100 ppm, que depois de transcorridos os tempos de contato a levedura reiniciou o crescimento como mostra a FIGURA 8; a sequência dos tubos da esquerda para direita representa respectivamente, o controle e os tratamentos com as concentrações: 0; 10; 50; 100 e 200 ppm. Nas primeiras 24 horas há formação de biomassa apenas nos tubos contendo o controle e a concentração 10ppm (FIGURA 8a). Em 48 horas a cultura apresenta crescimento em 50 ppm (FIGURA 8b). E após 72 horas de tempo de contato, é visível a formação de biomassa em 100 ppm indicando crescimento da cultura que não fora notificado anteriormente (FIGURA 8c). Somente na concentração de 200 ppm a cultura de *S. cerevisiae* não apresentou formação de biomassa, sendo que o experimento foi acompanhado durante 13 dias. Verificando

assim, que nesta concentração o Poliquilgerm[®] apresentou efeito fungicida sobre a cultura de *S. cerevisiae*.

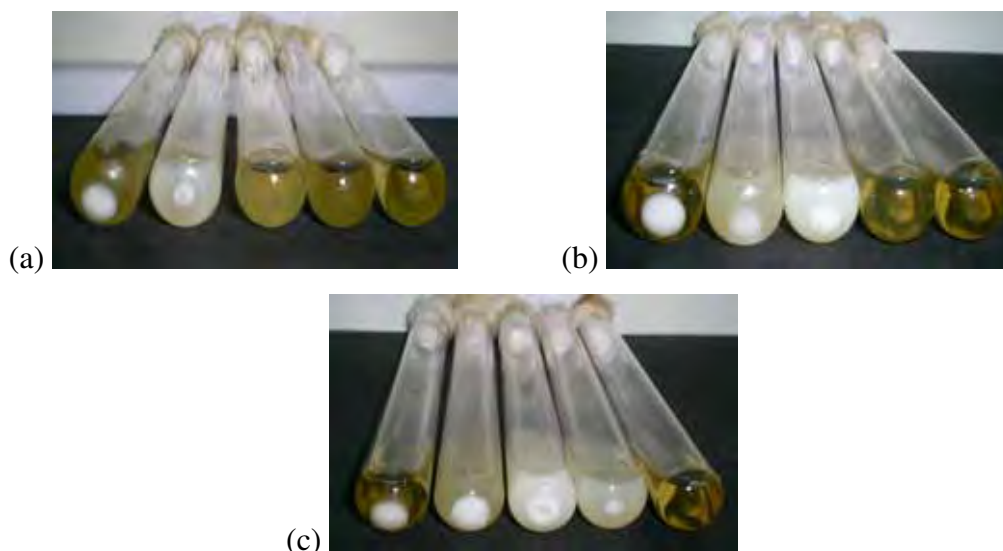


Figura 8. Teste da viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* na presença do Poliquilgerm[®] nas concentrações 0; 10; 50; 100 e 200 ppm respectivamente nos tubos da esquerda para direita, durante 24(a); 48(b) e 72(c) horas cultivado em meio de Sabouraud líquido a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Depois de constatada a concentração inibitória para o crescimento da levedura, empregou-se concentrações mais baixas, que posteriormente seriam testadas sobre as bactérias contaminantes, buscando assim encontrar um valor que inibisse a população bacteriana, mas não afetasse a viabilidade de *S. cerevisiae*. Desta forma o comportamento da levedura foi avaliado nas concentrações menores de: 0,5; 1 e 5 ppm. Nestas condições, constatou-se que diferentemente da situação anterior, a cultura apresentou formação de biomassa nas primeiras 24 horas em todas as concentrações testadas mantendo o crescimento durante as 72 horas observadas.

Com esses dados foi possível verificar que na medida em que há aumento da concentração do Poliquilgerm[®] há diminuição da biomassa e que a levedura é sensível ao biocida apenas em altas concentrações do produto, permitindo trabalhar com segurança determinadas concentrações sobre as bactérias contaminantes.

Resultados semelhantes foram obtidos por Oliva-Neto & Yokoya (2001) que testaram diversos compostos antimicrobianos sobre *S. cerevisiae*, *L. fermentum* e

L. mesenteroides e, embora alguns deles tenham apresentado a mesma faixa inibitória tanto para as bactérias quanto para a levedura, como é o caso de: metilditiocarbamato (Busan 40), tiocianato (Busan 110), bromofenato (Biopen 400) e n-alquildimetilbenzil cloreto de amônio. Os autores constataram que a maioria dos compostos testados a concentração inibitória para a levedura era sempre superior à concentração que inibia as bactérias. Apenas os antibióticos testados não apresentaram efeito algum sobre *S. cerevisiae*, mas vale lembrar que o uso desses compostos pode ser muito oneroso e que atualmente, as indústrias de etanol têm considerado aceitável uma contaminação bacteriana da ordem de 10^5 UFC/mL, não sendo economicamente viável reduzir este nível (ALCARDE et al., 2003). Por isso há a busca constante de biocidas alternativos mais econômicos, que sejam eficientes para solucionar problemas de contaminações bacterianas nas usinas e destilarias, pois estas indústrias exigem grande quantidade de antimicrobianos. E constitui um fator importante o fato do inibidor não apresentar condições para que se estabeleça resistência de bactérias ao produto, como no uso de antibióticos.

Meneghin et al. (2007) também testaram o dióxido de cloro como biocida alternativo sobre o fermento; *Bacillus subtilis*; *Leuconostoc mesenteroides*; *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus fermentum* e compararam com a ação de Kamoran a 3ppm (indicado pelo fabricante). Obtiveram o mesmo efeito inibidor sobre as bactérias em concentrações que variaram de 50 a 200 ppm de dióxido de cloro. Porém deve ser usado com cautela, pois valores maiores que 50ppm também inibiram a levedura.

O uso de um biocida proveniente de matéria prima renovável abre margem para testar inúmeras fontes, diminuindo os custos dos antimicrobianos, uma vez que a indústria tem seu foco na relação custo-benefício menor gasto possível, aumentando sua produção e margem de lucro. Outro trabalho realizado por Bregagnoli (2006) analisou o comportamento de microrganismos da produção de cachaça quando submetidos a biocidas. Comparou a ação do extrato de própolis e de pomelo com da ampicilina, verificando que a própolis apresentou o mesmo efeito que a ampicilina. Isso comprova que a possibilidade de se obter biocidas naturais é uma alternativa relevante, uma vez que apresentam resultados semelhantes aos convencionais e por serem na maioria das vezes, economicamente viáveis.

Como fora verificado em trabalhos que testaram a ação do biocida Poliquilgerm[®] sobre microrganismos de interesse odontológico (FERREIRA et al., 1999ab, 2002; LEONARDO et al., 2001) e clínico (BERTOLETTI et al., 2004 e MESSETTI et al., 2005) e após análise dos resultados, que apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, este trabalho também abre opção do uso de ésteres derivados do óleo da mamona como um biocida potencial para ser usado nas indústrias sucro-alcooleiras.

A TABELA 5 mostra os resultados da análise de variância ($p < 0,001$) com dois fatores de variação: tempo (4) e concentração (8), onde todos os valores de F foram significativos concluindo que há diferença entre o tempo, a concentração e interação desses fatores sobre a viabilidade celular, taxa de brotamento e viabilidade dos brotos.

Tabela 5. Análise da variância com dois fatores de variação ($p < 0,001$) para comparação entre os tempos de contato (4), concentração de Poliquilgerm[®] (8) e interação entre esses fatores sobre a viabilidade celular, taxa de brotamento e viabilidade dos brotos de *Saccharomyces cerevisiae*

Avaliação	R ²	Coeficiente de variação	Fatores (valores de F)		
			Tempo	Concentração	Tempo X Concentração
Viabilidade celular	0.899780	18.66259	122.29*	390.66*	43.84*
Taxa de brotamento	0.492372	66.04678	7.07*	44.35*	4.90*
Viabilidade dos brotos	0.865788	24.98094	57.77*	26.62*	306.40*

*significativo ao nível de 1%

Os resultados do teste de Tukey ($p < 0,05$) mostraram que a viabilidade celular de *S. cerevisiae* não apresentou diferença significativa entre os tempos 48 e 72 horas e entre as concentrações de 0,5 e 1 ppm e 10 e 50 ppm. A taxa de brotamento não se diferiu entre os tempos 0 e 72 horas e entre 24 e 48 horas. Os tratamentos entre as concentrações 0 a 5 ppm não apresentaram diferença entre si, assim como entre 10, 50 e

100 ppm para a formação de brotos. A viabilidade dos brotos de *S. cerevisiae* não se apresentou diferente nos tempos 24 e 72 horas e nos tratamentos com as concentrações 0,5 e 1 ppm e com 10 e 50 ppm (TABELAS 6 e 7).

Tabela 6. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação múltipla entre as médias dos tempos de contato com o biocida para viabilidade celular, taxa de brotamento e viabilidade dos brotos de *Saccharomyces cerevisiae*

Tempo (h)	Média dos tempos (%)		
	Viabilidade celular	Taxa de brotamento	Viabilidade dos brotos
0	47,216 c	7,544 b	45,053 c
24	64,775 b	9,578 a	60,289 b
48	73,995 a	10,147 a	69,317 a
72	71,015 a	7,284 b	59,984 b

OBS.: As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, não diferem entre si segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 7. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para análise da ação do Poliquilgerm® comparando as médias entre as concentrações sobre a viabilidade celular, taxa de brotamento e viabilidade dos brotos de *Saccharomyces cerevisiae*

Concentração Poliquilgerm® (ppm)	Média das concentrações (%)		
	Viabilidade celular	Taxa de brotamento	Viabilidade dos brotos
0	98,234 a	13,244 a	96,802 a
0,5	91,995 b	12,905 a	87,696 b
1	88,213 b	14,382 a	81,800 b
5	68,966 c	11,548 a	65,930 c
10	51,711 d	6,306 b	42,788 d
50	49,453 d	5,854 b	42,455 d
100	37,936 e	4,243 b	30,101 e
200	15,507 f	0,962 c	5,735 f

OBS.: As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Os resultados da interação entre os tempos e as concentrações estudados podem ser acompanhados nas FIGURAS 9, 10 e 11 que representam respectivamente a variação média e desvio padrão da viabilidade celular, da taxa de brotamento e da viabilidade dos brotos de *S. cerevisiae*.

Na FIGURA 9, comparando-se o controle com os tratamentos, verificou-se que nas concentrações 0,5 e 1 ppm até 48 horas, a viabilidade da cultura foi maior que 90%, ficando próximo do controle que atingiu valores entre 90 e 99%. Há um decaimento na taxa de viabilidade a partir de 72 horas de tempo de contato em concentrações maiores que 5 ppm. A ação fungistática do Poliquilgerm® foi observada nas concentrações de 50 e 100 ppm, que a partir de 48 horas as células que possivelmente se adaptaram ao meio voltaram a apresentar crescimento. Em 200 ppm de concentração do produto a viabilidade celular é muito baixa, não ultrapassando 25%.

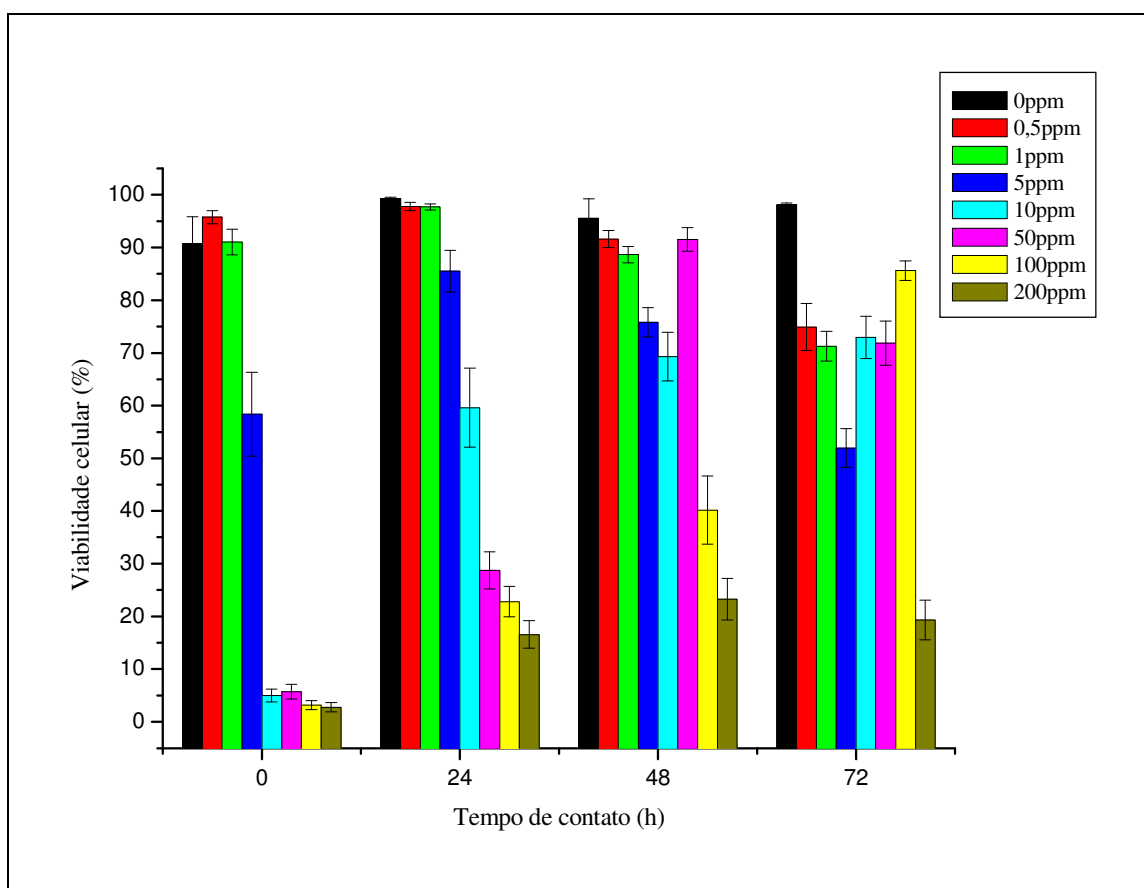


Figura 9. Variação média e desvio padrão da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em função do tempo de contato e concentração do Poliquilgerm® cultivado em meio de Sabouraud líquido a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

A FIGURA 10 mostra que a taxa de brotamento acompanha a viabilidade celular de *S. cerevisiae*. Nas concentrações 0,5 e 1 ppm até 48 horas o brotamento da cultura foi em torno de 14%, atingindo valores próximo do controle que chegou a 15,5%. Nos tempos 24 e 48 horas observou-se que porcentagem de brotamento é semelhante entre as concentrações de 0 a 5 ppm. A partir de 72 horas de tempo de contato há um decaimento na formação de brotos. Em 200ppm de Poliquilgerm® o brotamento da cultura foi baixo durante todo o tempo avaliado, atingindo o valor máximo em torno de 2% após 72h de tratamento.

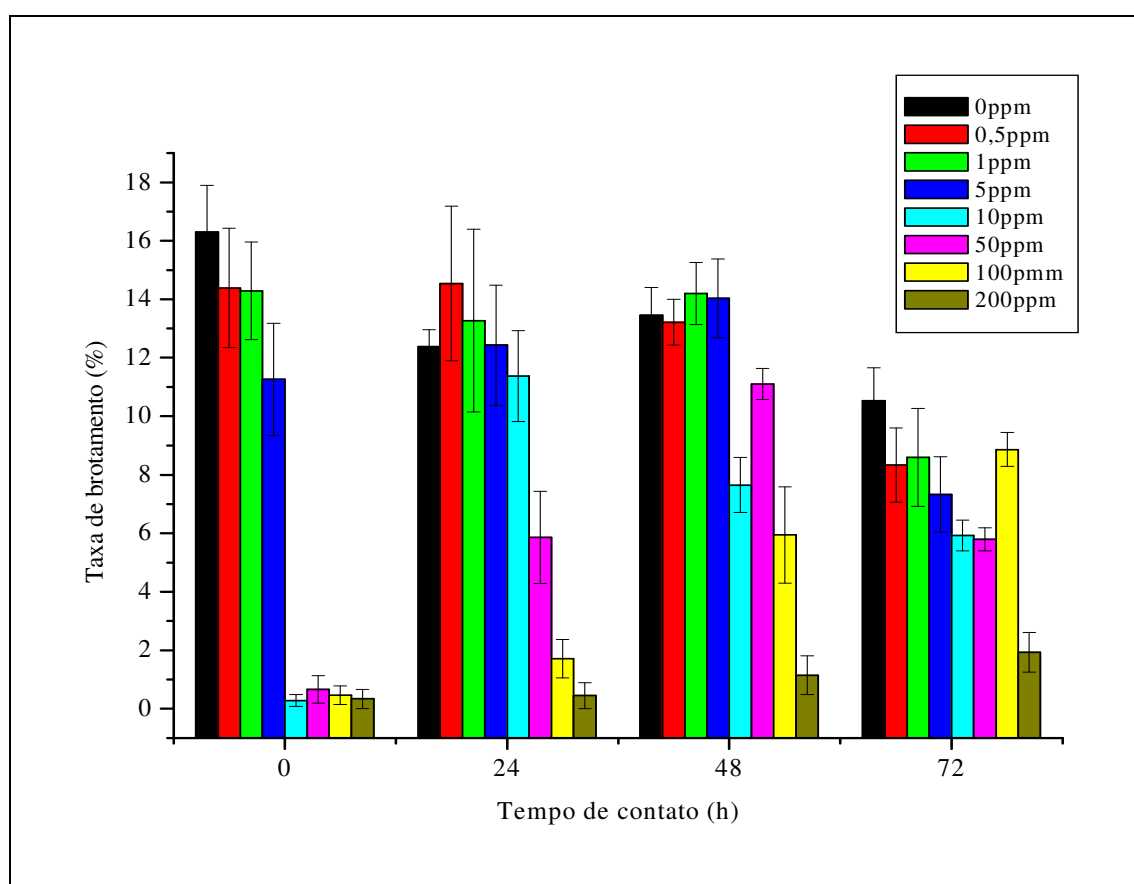


Figura 10. Variação média e desvio padrão da taxa de brotamento da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* em função do tempo de contato e concentração do Poliquilgerm® cultivado em meio de Sabouraud líquido a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Na FIGURA 11, observa-se que a viabilidade dos brotos apresenta comportamento semelhante ao da viabilidade celular. Nas concentrações 0,5 e 1 ppm

até 48 horas a viabilidade dos brotos chegou próxima do controle que atingiu valores em torno 98%. Comparando com o controle (0 ppm) há um decaimento maior na viabilidade a partir de 72 horas de tempo de contato. Também se observou a ação microbiostática do Poliquilgerm® até 48 horas nas concentrações 50 e 100ppm, onde o número de brotos voltou a crescer a partir desse tempo.

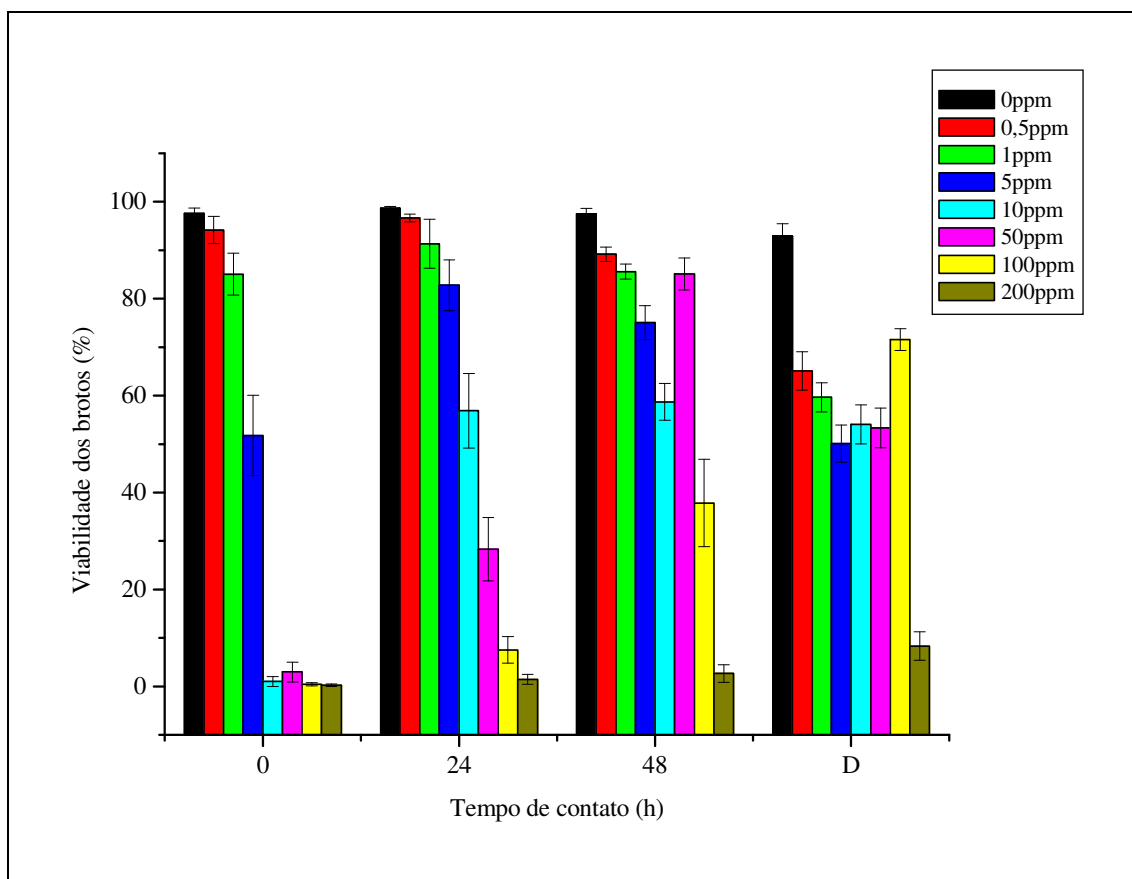


Figura 11. Variação média e desvio padrão da viabilidade dos brotos de *Saccharomyces cerevisiae* em função do tempo de contato e concentração do Poliquilgerm® cultivado em meio de Sabouraud líquido a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

A quantidade de flocos por mL não apresentou correlação entre as concentrações e os tempos estudados. Apenas em 48 e 72 horas houve formação mais expressiva de flocos, sendo maior em 100 ppm do biocida. Pode-se supor que o fato dessa variação na formação de flocos o Poliquilgerm® tenha interferido com as proteínas e fosfomananas da superfície celular (FIGURA 12).

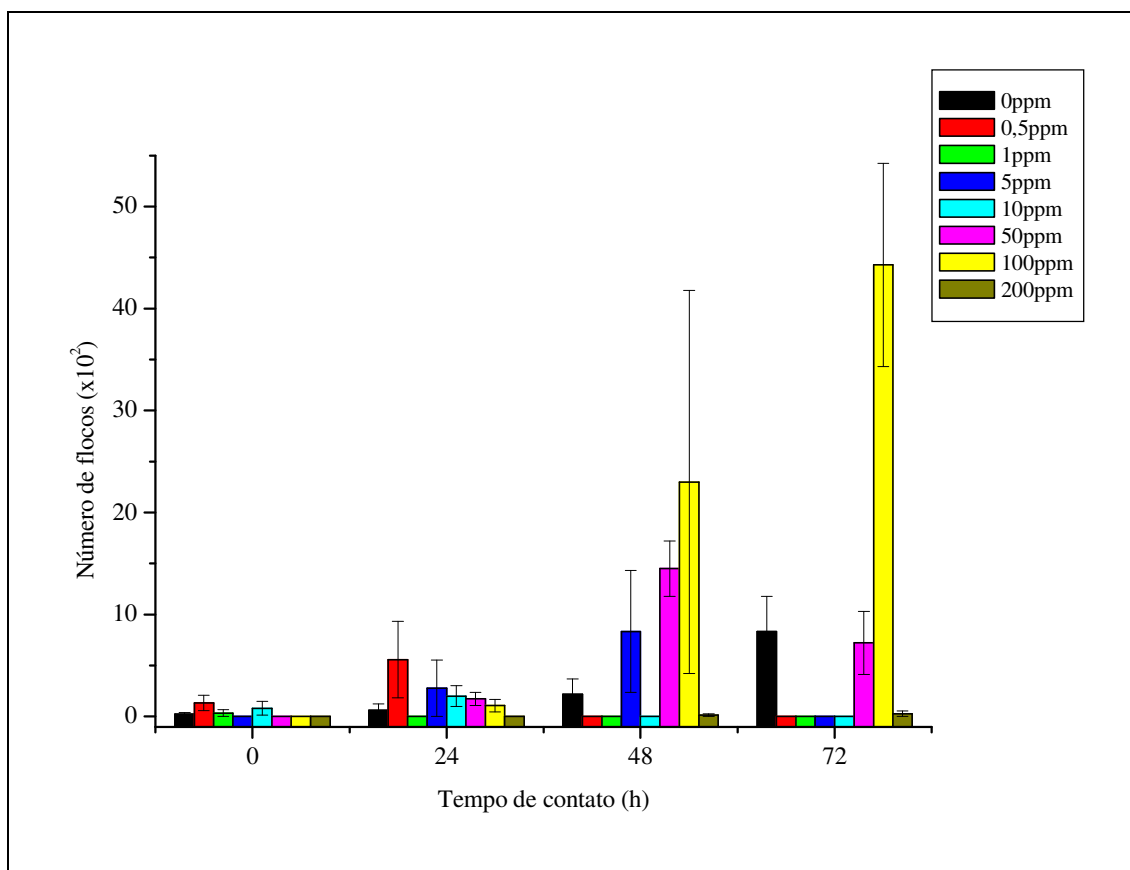


Figura 12. Variação média e desvio padrão do número de flocos *Saccharomyces cerevisiae* em função do tempo de contato e concentração do Poliquilgerm[®] cultivado em meio de Sabouraud líquido a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.2. Concentração inibitória mínima (CIM) do *Lactobacillus fermentum* frente ao Poliquilgerm[®]

Na produção de álcool com fermentação por leveduras, a floculação manifesta-se como um mecanismo natural de agregação de células. Essa condição pode ser induzida por vários fatores, entre eles, a interação entre bactérias que induzem o fenômeno, como *Lactobacillus fermentum* e as leveduras. Esse fato torna-se prejudicial para o processo, pois tanto os processos que utilizam o sistema de recuperação de células por centrifugação, como os que não o utilizam, ocorrem perdas excessivas de fermento em consequência dos problemas operacionais decorrentes da floculação, comprometendo seriamente o desempenho industrial (SOUZA e MUTTON, 2004).

Além do mais o isolamento freqüente de cepas de *L. fermentum* em fermentações floculadas evidenciou sua importância como contaminante de processos industriais (OLIVA NETO, 1990; GUERRA e ANGELIS, 1998; LUDWIG et al., 2001). O trabalho realizado por Nobre et al. (2007), mostrou que a *S. cerevisiae* foi afetada no cultivo misto com *L. fermentum* reduzindo em 73,5% a viabilidade da levedura e com *B. subtilis* que reduziu a viabilidade em 59,2%. Desta forma é necessário realizar um controle minucioso da contaminação por esta bactéria, evitando assim as constantes perdas na produção de etanol. Com esse intuito este trabalho procurou encontrar uma concentração segura para *S. cerevisiae*, na qual o combate fosse eficaz sobre *L. fermentum*.

No teste da concentração inibitória mínima bacteriana, avaliaram-se os resultados das contagens de UFC/mL dos plaqueamentos entre o controle e os tratamentos. O estudo mostrou no tempo zero o *L. fermentum* estava presente em todas as concentrações avaliadas, porém mostrou decréscimo do número de UFC/mL conforme aumentou-se a concentração do produto. Assim, pode-se constatar o efeito bactericida do Poliquilgerm[®] sobre a bactéria desde o tempo inicial.

Os resultados da contagem de UFC/mL dos plaqueamentos foram avaliados mediante análise de variância com dois fatores ($p < 0,001$): tempo (4) e concentração (5). Mostrando estatisticamente que houve diferença significativa entre os fatores avaliados e interação entre eles (TABELA 8). Para a realização das análise utilizou-se o logaritmo do número de UFC/mL obtido ($=\ln(\text{UFC}+1)$).

Tabela 8. Análise da variância com dois fatores ($p < 0,001$) do logaritmo de UFC/mL de *Lactobacillus fermentum* para comparação entre os tempos de contato (4), concentração de Poliquilgerm[®] (5) e interação entre esses fatores

Fatores	Valores de F
Tempo	2659.65*
Concentração	761.56*
Tempo X Concentração	7865.48*

$R^2 = 0.998069$; Coeficiente de variação = 4.456445; média = 11.49123

*significativo ao nível de 1%

As TABELAS 9 e 10 mostram os resultados do teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação múltipla entre as médias de cada tempo de contato e concentrações testados sobre a viabilidade de *L. fermentum*. Ambos os fatores apresentaram diferença significativa entre si em todos os tratamentos realizados. Os resultados da interação entre esses fatores estão expressos na FIGURA 13.

Tabela 9. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação entre as médias do logaritmo de UFC/mL dos tempos de contato com Poliquilgerm[®] sobre a viabilidade de *Lactobacillus fermentum*

Tempo (h)	Médias dos tempos (lnUFC)
0	19,35 a
24	10,09 b
48	8,11 d
72	9,28 c

OBS.: As médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 10. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação entre as médias de UFC/mL das concentrações de Poliquilgerm[®] sobre a viabilidade de *Lactobacillus fermentum*

Concentração Poliquilgerm [®] (ppm)	Médias das concentrações (lnUFC)
0	22,72 a
10	20,87 b
50	5,10 c
100	3,50 e
200	4,10 d

OBS.: As médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Transcorridos 24 horas de incubação, verificou-se o crescimento da cultura apenas nas concentrações 0 e 10 ppm e, a partir de 50 ppm a inibição na formação de UFC/mL de *L. fermentum* foi total, atingindo 100% nas concentrações de 50; 100 e 200 ppm. Nos tempos seguintes observou-se o mesmo resultado, porém menor número de UFC/mL na concentração 10 ppm, que a partir de 48h teve um significativo decréscimo de mais de uma unidade logarítmica, quando comparado ao controle (0 ppm) que atingiu 10^{10} UFC/mL (FIGURA 13). Hynes et al. (1997) observaram situação semelhante quando verificaram nas concentrações testadas (0,5; 2,0 e 6,0 mg Kg⁻¹ por meio), a ação da virginiamicina sobre *L. fermentum*. Após 72h em 0,5 mg Kg⁻¹ houve um decréscimo de uma unidade de log e em 6 mg Kg⁻¹ decréscimo de duas unidades logarítmicas, enquanto o controle (cultura sem biocida) atingiu 10^9 bactérias por mL⁻¹.

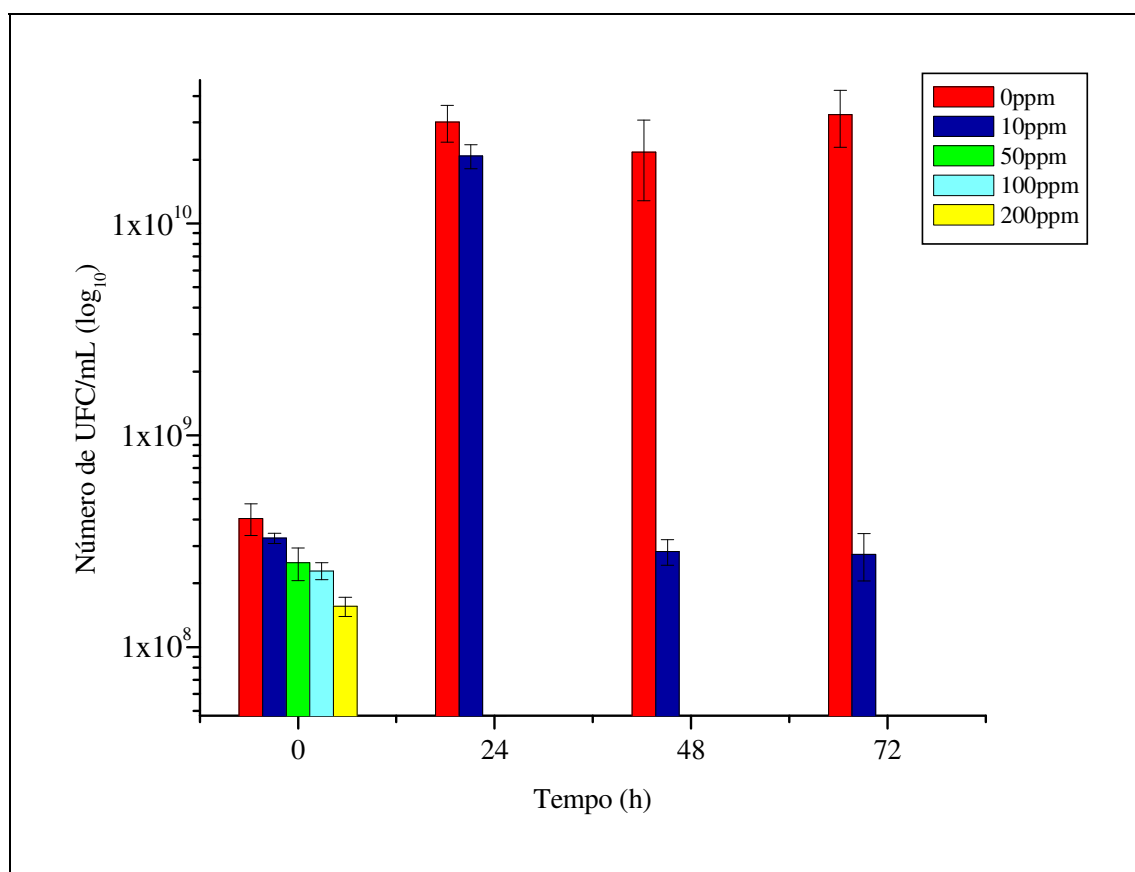


Figura 13. Variação média e desvio padrão da viabilidade *Lactobacillus fermentum* cultivado em meio MRS a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ em função do tempo de contato e concentração do Poliquilgerm[®].

Thomas et al., (2001) estudaram a influência da contaminação por lactobacilos durante a fermentação etanólica por *S. cerevisiae* e verificaram que quando o número de células da levedura foi superior ou ao menos igual ao da bactéria, o crescimento do contaminante foi inibido. Entretanto, o rendimento etanólico e a viabilidade da levedura diminuíram respectivamente 22% e 45%, quando o número de células de *L. fermentum* ultrapassou o de *S. cerevisiae*. Os estudos realizados com Poliquilgerm[®] mostraram uma eficiente diminuição do número de UFC/mL dessa bactéria, uma vez que os valores diminuem de 10^{10} para zero em 24 horas de tratamento a 50 ppm. A partir destes resultados pode-se encontrar a menor concentração que iniba o *L. fermentum* ao nível que a levedura não seja afetada e a produção de álcool não decaia.

Além do plaqueamento, realizou-se também o teste de reversão quando os tratamentos não apresentaram formação de colônias nas placas, verificando se o efeito do biocida sobre *L. fermentum* foi desde o início do tratamento. Os resultados estão apresentados TABELA 11, indicando crescimento da cultura no meio que apresentou turvação (+) e não crescimento no meio que permaneceu translúcido (-) como no tubo controle (meio sem inóculo). Estes resultados indicam o poder bactericida do Poliquilgerm[®] sobre *L. fermentum*.

Tabela 11. Resultados do teste de reversão de *Lactobacillus fermentum*, cultivado em meio MRS a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, avaliados após 24 e 48 horas de incubação pela visualização da turbidez do meio indicando ou não crescimento, onde (+) turvo e (-) não turvo

Tempo (h)	Concentração Poliquilgerm [®] (ppm)				
	0	10	50	100	200
0	+	+	+	+	+
24	+	+	-	-	-
48	+	+	-	-	-
72	+	+	-	-	-

5.3. Verificação do desempenho do Poliquilgerm® quanto à inibição na produção de ácido láctico por *Lactobacillus fermentum* e “pool” de bactérias

Após análise dos testes de gram e microscopia verificou-se que todas as bactérias utilizadas neste experimento apresentaram forma celular de bastonetes e eram gram positivas.

O meio de cultura a base de caldo de cana é uma alternativa mais econômica para realização de testes com microrganismos provenientes da fermentação etanólica, uma vez que o uso de meios sintéticos, mesmo sendo práticos, é muito oneroso. Algumas pesquisas foram desenvolvidas com o meio de caldo de cana enriquecido e demonstraram resultados eficazes. Oliva-Neto (1995) estudou o cultivo de *L. fermentum* e verificou que o enriquecimento com aminoácidos específicos (valina, leucina e isoleucina) presentes no extrato de levedura, foram essenciais para o crescimento bacteriano. Oliveira-Freguglia e Horii (1998) observaram resultados semelhantes no crescimento de *L. fermentum* quando comparou em meio de cultura de caldo de cana suplementado com extrato de levedura e peptona e meio MRS. Desta forma buscou-se o uso deste meio alternativo para a realização deste experimento.

As contagens de UFC/mL feitas no tempo zero para realização dos testes apresentaram 10^8 - 10^9 UFC/mL, uma vez que estes níveis de contaminação exercem influência negativa sobre viabilidade de *S. cerevisiae* (OLIVA-NETO, 1995; OLIVEIRA-FREGUGLIA e HORII, 1998 e DORTA, 2006). Oliva-Neto, (1990) mostrou ainda comparativamente entre ciclos iniciais de fermentação com reciclagem de células e após o 8º ciclo, que o *L. fermentum* inibi a fermentação etanólica atingindo níveis de 10^9 UFC/mL, causando diminuição no rendimento alcoólico da fermentação em 46,7 a 53,5%.

A viabilidade de *S. cerevisiae* pode ser influenciada por contaminantes desde a competição pelo substrato até a produção de metabólitos tóxicos à levedura, como os ácidos orgânicos. Dentre os principais estão o ácido acético e o ácido láctico. Porém o ácido láctico é o subproduto mais abundante da contaminação bacteriana, pois mais de 50% da população de contaminantes no mosto e nas dornas de fermentação pertencem ao gênero *Lactobacillus* (ROSALES, 1989; OLIVA-NETO, 1990 e NOBRE, 2007), sendo o *L. fermentum* a espécie predominante com 26,20% (GALLO, 1989).

Além do uso do açúcar pelas bactérias lácticas para produção do ácido láctico, este produto também afeta o rendimento alcoólico devido a sua toxicidade sobre a levedura, que perde sua capacidade reprodutiva, diminuindo assim a população viável durante a etapa fermentativa (YOKOYA, 1991; NARENDRANATH et al., 1997; HYNES et al., 1997; THOMAS et al., 2001). Narendranath et al. (2001a) estudaram os mecanismos de inibição do ácido acético e do ácido láctico sobre *S. cerevisiae* e constataram que concentrações maiores que 0,4% (p/v) de ácido láctico foi suficiente para provocar a diminuição do pH no meio afetando o crescimento da levedura mediante a alteração da atividade enzimática da H⁺-ATPase da membrana plasmática. Esta enzima regula o pH intracelular e promove a força motora para elevação de nutriente, através de um importante processo fisiológico: a bomba de prótons (SOUZA et al., 2001). Por isso diversos estudos têm sido realizados com o intuito de controlar a contaminação e a produção do ácido láctico pelas bactérias lácticas, assim como este trabalho.

Costa (2006) realizou um estudo dos metabólitos excretados por *Lactobacillus* com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico. Dentre as 16 linhagens de bactérias analisadas pela autora, 50% eram heterofermentativas. Neste grupo havia 4 linhagens de *L. fermentum* constatando que uma produziu apenas o isômero L(+)-lactato e as outras três produziram os dois isômeros D(-) e L(+). Neste trabalho analisou-se apenas a quantidade do isômero L(+) em mmol/L, pois a determinação da quantidade de ácido láctico nas amostras foi realizada em biosensor enzimático amperométrico específico para análise de L(+)-lactato, produzido no sangue.

Os resultados deste experimento mostram grande importância quando se comparam os valores de ácido láctico produzido nos tratamentos com as diferentes concentrações de Poliquilgerm[®] e no controle (0 ppm), que demonstraram significativa diminuição dessa produção nas culturas isoladas de *L. fermentum*, “pool” de bactérias, *S. cerevisiae* e nas culturas associadas de *L. fermentum* mais *S. cerevisiae* e “pool” de bactérias mais *S. cerevisiae*.

Os resultados foram submetidos à análise da variância fatorial 5x6 ($p < 0,001$) que está apresentado na TABELA 12, mostrando que houve diferença significativa entre as culturas (5), entre as concentrações (6) e na interação cultura e concentração.

Tabela 12. Análise da variância fatorial 5x6 ($p < 0,001$) para comparação entre as culturas (5) de *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactobacillus fermentum*; “pool” de bactérias e associação entre elas; concentrações de Poliquilgerm® (6) e interação entre esses fatores, no teste de produção de ácido láctico

Fatores	Valores de F
Cultura	94.91*
Concentração	229.78*
Cultura X Concentração	18.81*

$R^2 = 0.877463$; Coeficiente de variação = 40.94532; média = 3.631791

*significativo ao nível de 1%

Aplicou-se então o teste de Tuckey ($p < 0,05$) para comparação múltipla entre as médias de produção de ácido láctico pelas culturas frente ao Poliquilgerm®. Apenas a cultura de *S. cerevisiae*, que não produz ácido láctico, apresentou diferença significativa das demais. Os tratamentos com as concentrações 1; 5 e 10 ppm e 5; 10 e 20 ppm não diferiram estatisticamente entre si (TABELAS 13 E 14).

Tabela 13. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparar a ação do Poliquilgerm® sobre o desempenho metabólico entre as médias da produção de ácido láctico das culturas *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactobacillus fermentum*; “pool” de bactérias e associação entre estas culturas

Culturas	Médias
<i>L. fermentum</i>	4,77 a
<i>S. cerevisiae</i> + <i>L. fermentum</i>	4,67 a
“Pool” bactérias	4,48 a
<i>S. cerevisiae</i> + “Pool”	4,14 a
<i>S. cerevisiae</i>	0,51 b

OBS.: As médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 14. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparar a ação de diferentes concentrações do Poliquilgerm[®] entre as médias da produção de ácido láctico pelas culturas puras e associação de *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum* “pool” de bactérias

Concentração Poliquilgerm [®] (ppm)	Médias
0	9,70 a
0,5	7,13 b
1	2,60 c
5	2,03 cd
10	1,99 cd
20	1,38 d

OBS.: As médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

A FIGURA 14 mostra a variabilidade média e o desvio padrão dos resultados da dosagem de ácido láctico. Pode-se constatar que a inibição foi cerca de 90% de produção de ácido láctico frente à concentração de 20 ppm, podendo indicar também queda na população da bacteriana, uma vez que a quantidade do ácido indica o grau de contaminação (VENTURA e ANGELIS, 2007). Na concentração 0,5 ppm de Poliquilgerm[®] a inibição foi com menor intensidade, em torno de 50%, porém este resultado é significativo visto que quanto maior o nível de ácido láctico no meio maior a interferência na viabilidade da levedura (MAIORELLA et al., 1983; NARENDRANATH et al., 2001b).

Durante este experimento verificou-se também a viabilidade da levedura pelo teste de fermentação com tubos de Durham, mantendo-se viável nas concentrações estudadas. Os resultados estão apresentados na TABELA 15, que através da formação ou não de bolhas de gás constatou-se se a levedura fermentou (+) ou não fermentou (-).

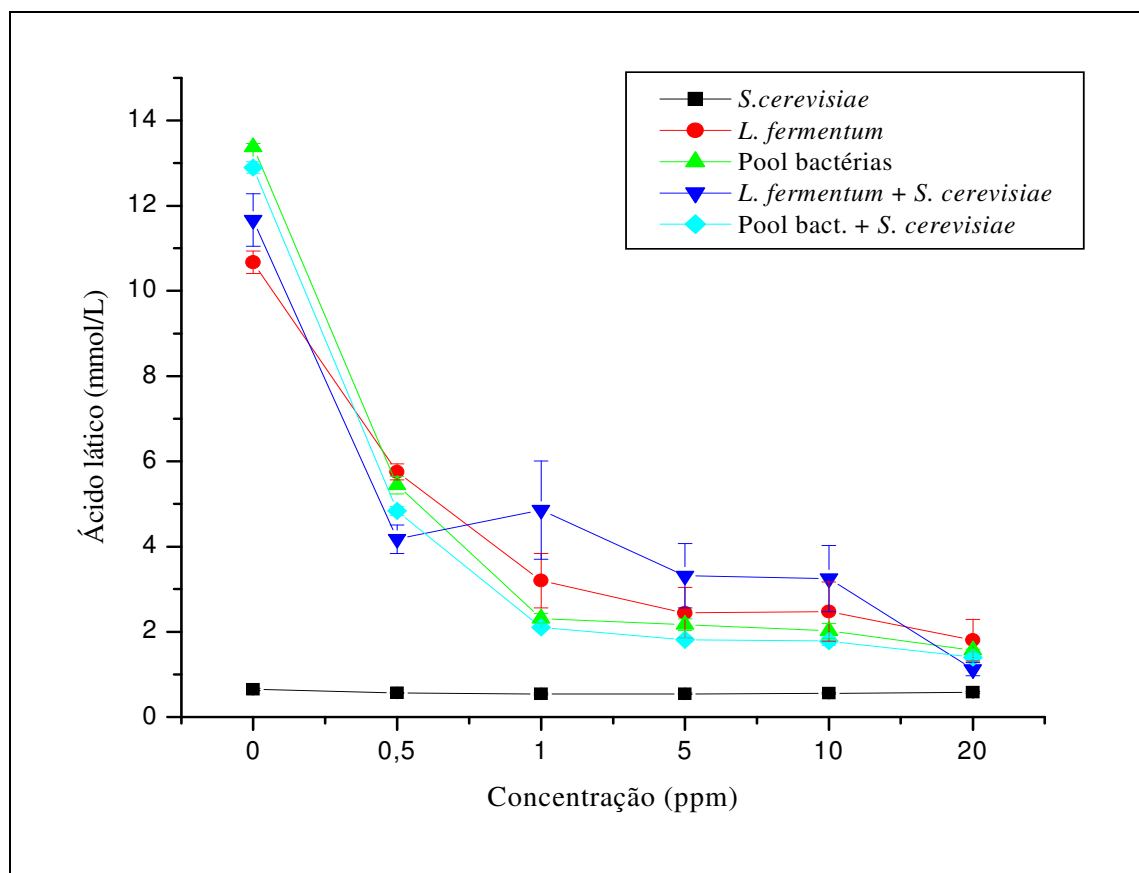


Figura 14. Variabilidade média e desvio padrão da dosagem de ácido láctico (mmol/L) nas concentrações de Poliquilgerm[®] estudadas sobre as culturas puras e mistas de *Lactobacillus fermentum*, “pool” de bactérias, *Saccharomyces cerevisiae* a após 24 horas de cultivo em meio CSN a 10°Brix a $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabela 15. Resultados do teste de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* com tubo de Durham, onde (+) fermentou e (-) não fermentou, após 24 e 48 horas de cultivo a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ em meio CSN a 10°Brix

Concentração Poliquilgerm [®] (ppm)	Culturas			
	<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. cerevisiae</i> + <i>L. fermentum</i>	
	24h	48h	24h	48h
0	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+
1	+	+	+	+
5	+	+	+	+
10	+	+	+	+
20	+	+	-	+

5.4. Ação do Poliquilgerm® na fermentação com cultura de *Saccharomyces cerevisiae* pura e em presença de bactérias contaminantes

O rendimento alcoólico foi avaliado comparando-se os resultados da produção de álcool entre a cultura pura de *S. cerevisiae* e cultura mista de *S. cerevisiae* com “pool” de bactérias contaminantes, nos tratamentos com diferentes concentrações de Poliquilgerm®, durante 13 horas de fermentação cultivado em meio CSN 10°Brix, a 30°C e sob agitação de 100rpm.

Para a realização do experimento verificou-se a viabilidade inicial da cultura da levedura em câmara de Neubauer, os resultados estão expressos na TABELA 16. Na avaliação da cultura mista as células de *S. cerevisiae* estavam floculadas devido à presença das bactérias contaminantes. Para contagem das células acidificou-se o meio até pH 3,0 com ácido sulfúrico 1:20 e em seguida diluiu-se 20 vezes a amostra avaliada. Quando não houve desfloculação utilizou-se também o ultra-som por 35 segundos. A viabilidade do “pool” de bactérias também foi verificada mediante a técnica de plaqueamento “Pour Plate”, os resultados apresentam-se na TABELA 17.

Tabela 16. Viabilidade percentual média do inóculo inicial de *Saccharomyces cerevisiae* para realização dos testes de fermentação, cultivado em meio CSN 10°Brix, por 24h a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$

Cultura	Viabilidade celular (%)	Taxa de brotamento (%)	Viabilidade dos brotos (%)	Flocos/mL
<i>S. cerevisiae</i>	99,64	8,92	99,99	4300
<i>S. cerevisiae</i> + “pool” de bactérias	96,21	5,35	99,99	4383

Tabela 17. Viabilidade média do inóculo inicial do “pool” de bactérias, para realização dos testes de fermentação, cultivado em meio CSN 10°Brix, por 24h a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$

Cultura	Número de UFC/mL
“pool” de bactérias	$3,05 \times 10^9$
<i>S. cerevisiae</i> + “pool” de bactérias	$2,83 \times 10^9$

Os resultados da produção de álcool foram submetidos à avaliação estatística de variância com dois fatores ($p < 0,001$), cultura (3) e concentração (5) e verificou-se que as diferenças entre o comportamento das culturas, as concentrações de Poliquilgerm® e a interação entre esses fatores foram significativos (TABELA 18).

Tabela 18. Análise da variância fatorial 3x5 ($p < 0,001$) para comparação entre as culturas (3) *Saccharomyces cerevisiae*; “pool” de bactérias e associação entre elas; as concentrações de Poliquilgerm® (5) e interação entre esses fatores, durante etapa fermentativa de 13h, a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$

Fatores	Valores de F
Cultura	127.81*
Concentração	2.78*
Cultura X Concentração	8.54*

$R^2 = 0.776125$; Coeficiente de variação = 45.89703; média = 2.846000

*significativo ao nível de 1%

Em seguida aplicou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação múltipla entre culturas e as concentrações. Segundo o teste, durante o experimento as culturas apresentaram comportamento diferente entre si e apenas na concentração 20 ppm observou-se diferença significativa quanto à produção de álcool (TABELAS 19 e 20).

Tabela 19. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparar a ação do Poliquilgerm[®] sobre o desempenho das culturas de “pool” de bactérias + *Saccharomyces cerevisiae*; *Saccharomyces cerevisiae* e “pool” de bactérias no teste de produção de álcool

Culturas	Médias
“Pool” + <i>S. cerevisiae</i>	4.6637 a
<i>S. cerevisiae</i>	3.8743 b
“Pool” bactérias	0.0000 c

OBS.: As médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 20. Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparar a ação do Poliquilgerm[®] entre as médias das concentrações estudadas no teste de produção de álcool pelas culturas de “pool” de bactérias; *Saccharomyces cerevisiae* e associação das duas culturas

Concentração Poliquilgerm [®] (ppm)	Médias
0	3.5562 a
1	3.4714 a
5	3.0262 a
10	2.6786 a
20	1.4976 b

OBS.: As médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Quando se comparou a quantidade de álcool produzido no controle da cultura pura da levedura (5,48%) com o controle da cultura mista (5,20%) verificou-se que essa diferença de 0,28% representa uma diminuição de 5,11% de rendimento, devida a presença de contaminantes durante a etapa fermentativa (FIGURA 15). Este é um valor estatisticamente não significativo (Tukey $p < 0,05$), mas se for considerado o volume das dornas nas indústrias e a quantidade de álcool produzida, representa grandes perdas na produção de etanol. Por exemplo, considerando que 0,28% (v/v) de etanol representa

perda de 2,8 mL/L, em uma dorna de 400 mil litros, haverá uma perda de 11200 mL ou 1120 L de etanol em um ciclo, se são realizados em média 3 ciclos por dia a perda total na produção seria de 3360 L de etanol por cada dorna em um dia.

Embora não seja estatisticamente significativo (Tukey $p < 0,05$), ao adicionar o biocida no meio com a cultura mista, observa-se que logo na menor concentração, 1 ppm, a porcentagem de álcool encontrada (5,41%) é semelhante ao encontrado no controle da cultura de *S. cerevisiae* livre de contaminantes. Isso também ocorre nas concentrações 5 e 10 ppm com 5,46% de álcool. Somente em 20 ppm o rendimento alcoólico diminui para 4,1%. Quando as diferentes concentrações são testadas no meio somente com a levedura, observou-se decaimento na produção de álcool (FIGURA 15).

Ainda não há explicações exatas do mecanismo de ação antimicrobiana do Poliquilgerm[®], mas esses resultados podem estar relacionados às diferenças na composição da parede celular da levedura e da bactéria quanto aos tipos de cadeias de açúcares que as formam. Alguns estudos realizados mostram a capacidade de ésteres derivados do óleo de mamona degradar moléculas de açúcares. Oliveira (2005) verificou a decomposição da sacarose por hidrólise em baixas concentrações de uma mistura de ésteres de óleo de mamona. Messetti et al. (2007), constataram que em presença do Poliquilgerm[®] a viscosidade do meio com *Leuconostoc mesenteroides*, bactéria produtora da goma dextrana diminuiu, indicando que há a possibilidade de um bloqueio na síntese de dextrana sacarase ou inibição do crescimento do microrganismo. Embora mais estudos devam ser realizados para verificar como esse biocida age sobre os microrganismos, diante dos resultados dos trabalhos citados, pode-se levantar a hipótese de que o Poliquilgerm[®] poderia ter degradado alguma cadeia glicosídica na parede celular da bactéria mais facilmente que na da levedura, visto que na FIGURA 15 acompanha-se a diferença no desempenho das culturas. Quando há associação do “pool” de bactérias com *S. cerevisiae* a produção de álcool é um pouco maior do que quando a levedura está em cultura pura, que na presença do biocida apresenta decaimento constante na produção de álcool. Ambas as culturas apresentaram menor rendimento alcoólico na concentração de 20 ppm. Talvez o Poliquilgerm[®] tenha agido competitiva e preferencialmente sobre a parede celular da bactéria. Nesta situação as bactérias neutralizariam o biocida deixando o meio livre para a fermentação pela levedura e quando a quantidade do biocida foi maior (20 ppm) teria agido também sobre

a levedura. Em cultura pura, supõe-se que o biocida agiria somente sobre a levedura inibindo a produção de álcool. Podendo ainda, a célula ter sofrido interferência na membrana celular considerando-se que o produto tem certa hidrofobicidade, por ser derivado de um óleo vegetal.

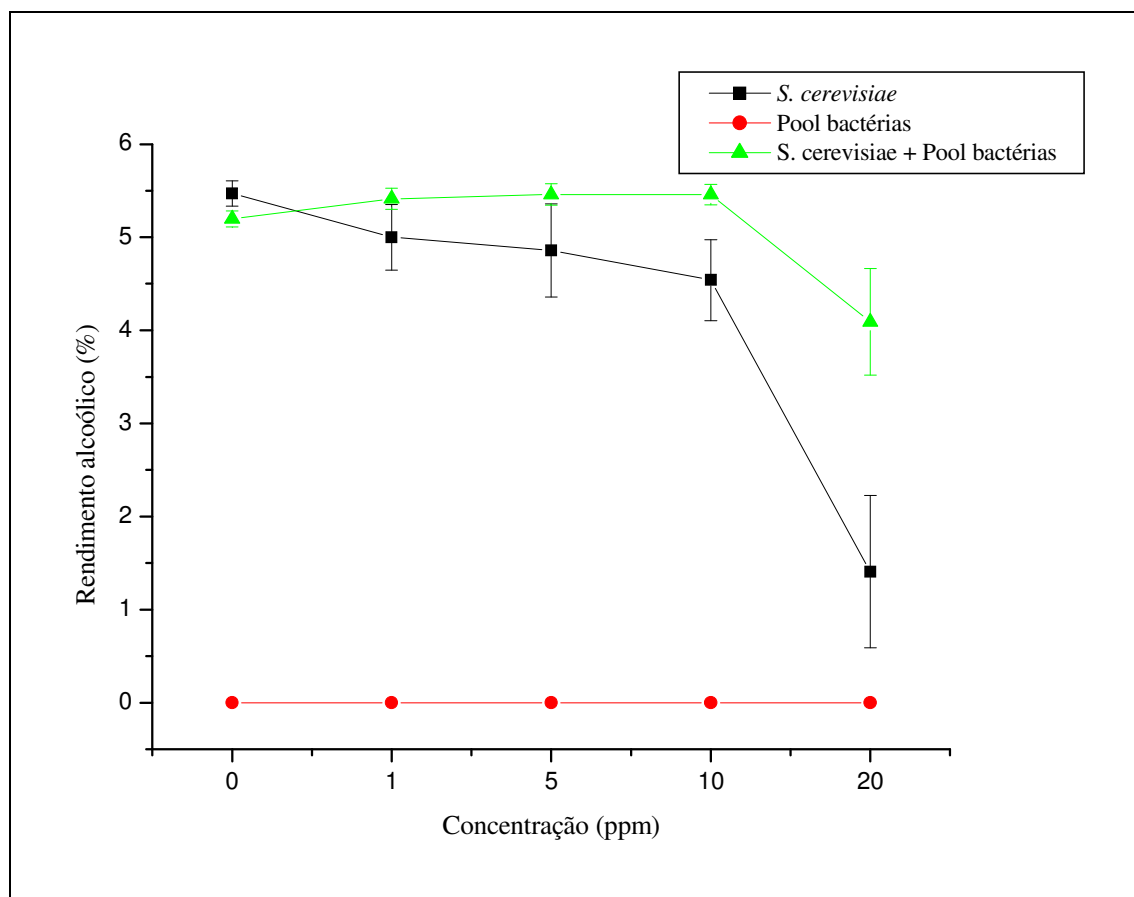


Figura 15. Variabilidade média e desvio padrão da produção de álcool das culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces cerevisiae* mais “pool” de bactérias, nas concentrações estudadas de Poliquilgerm®, cultivadas em meio CSN 10°Brix durante 13h, a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ sob agitação de 100 ± 10 rpm.

Estudos realizados em escala laboratorial comparando culturas pura de levedura e contaminada com bactérias lácticas mostraram que quando a contaminação bacteriana está presente conduz a uma diminuição dos rendimentos em etanol, inferior à cultura da levedura, reduzindo a utilização de carboidratos (glicose) e aumentando fortemente

acidez devido principalmente a produção de ácido lático e o pH final é menor. Além de um significativo aumento na produção de espuma. Ainda neste estudo certas cepas de bactérias lácticas causaram floculação de células de levedura. Portanto o menor rendimento etanólico não foi simplesmente devido à concorrência de carboidratos, mas a outros prováveis mecanismos (MAKANJUOLA et al., 1992).

Nas FIGURAS 16 e 17, pode-se acompanhar o consumo do açúcar durante tempo de fermentação sob efeito das diferentes concentrações de Poliqualgerm[®]. E ao comparar esses resultados com as curvas de produção de álcool na FIGURA 15 o decaimento do açúcar e o rendimento alcoólico estão coerentes, onde há maior porcentagem de álcool o consumo do açúcar também foi maior.

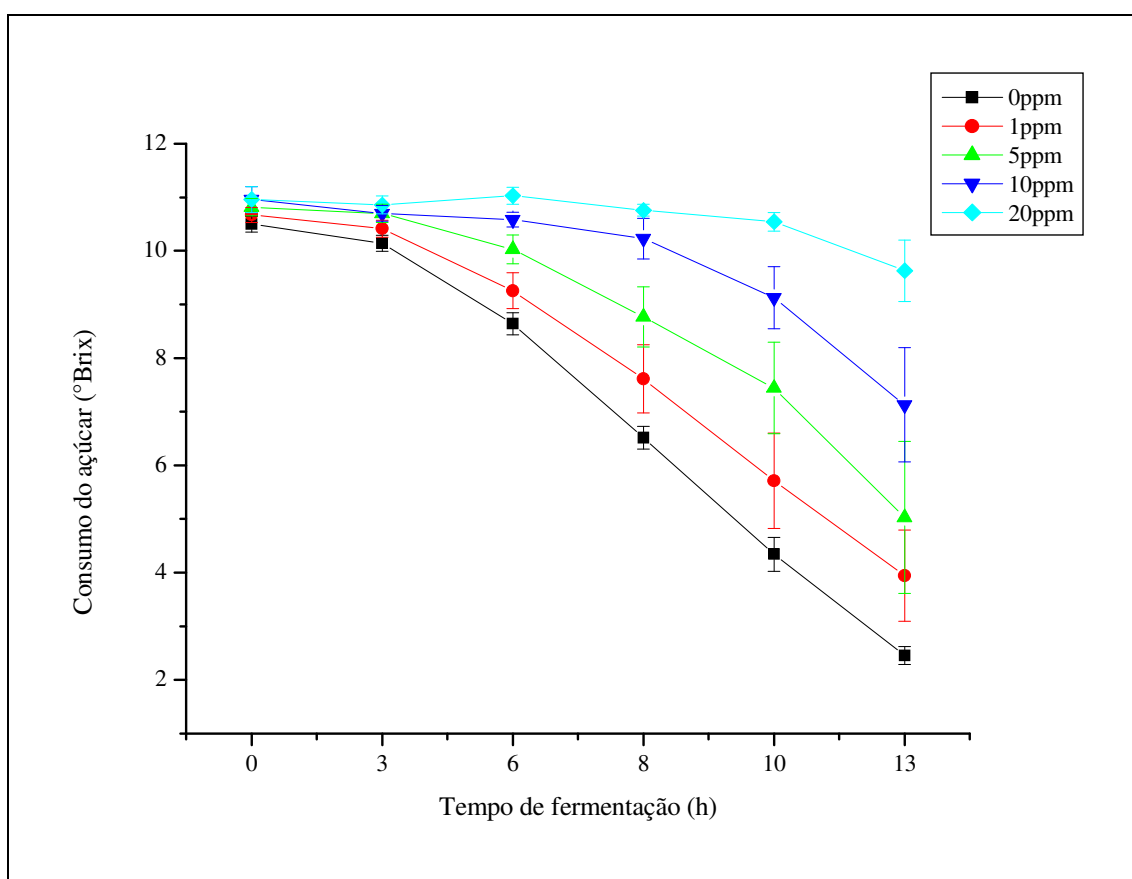


Figura 16. Média e desvio padrão do consumo do açúcar expresso em °Brix da cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, acompanhado durante 13h de fermentação, cultivado em meio CSN a 10°Brix a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$.

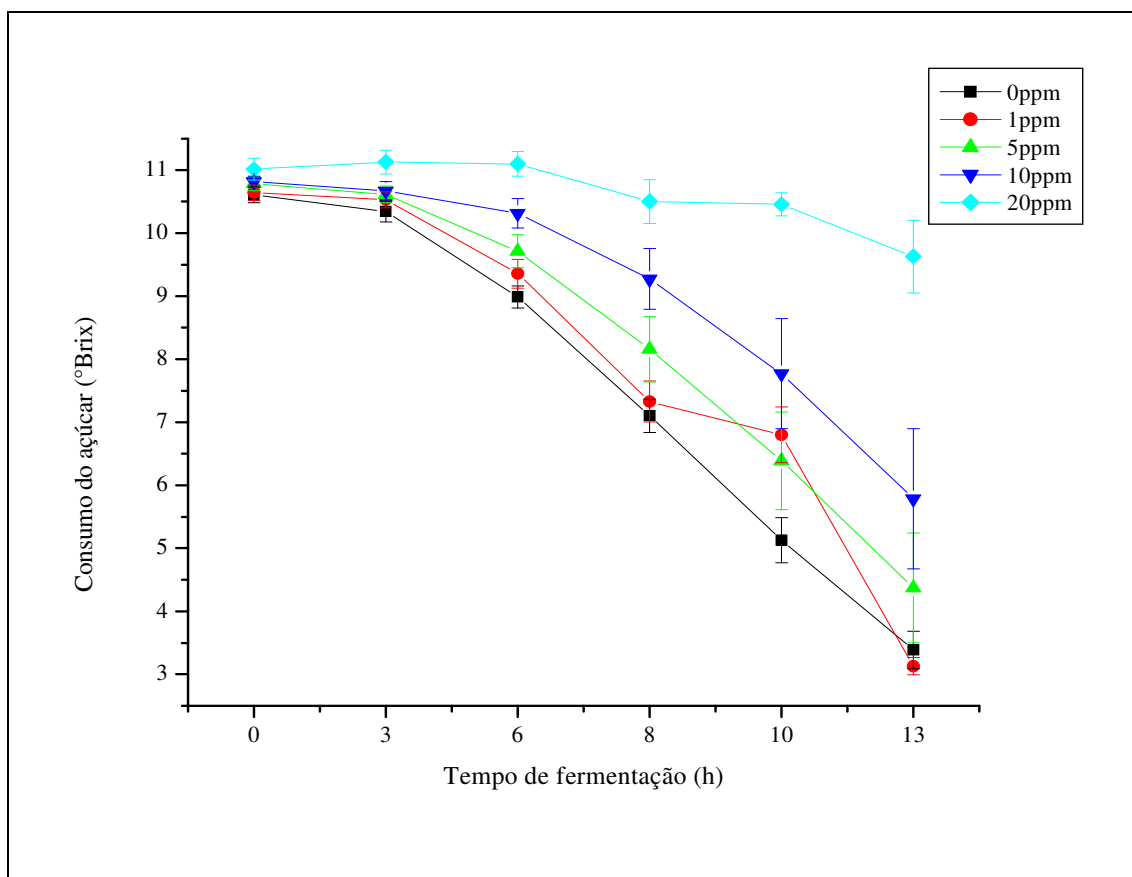


Figura 17. Média e desvio padrão do consumo do açúcar expresso em °Brix, da cultura mista de *Saccharomyces cerevisiae* com “pool” de bactérias, acompanhado durante 13h de fermentação em meio CSN a 10°Brix a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$.

A FIGURA 18 registra os resultados da dosagem de ART expressos em mg/mL de glicose. Onde o controle representa o meio CSN sem inóculo, seguido das concentrações de Poliquilgerm® avaliadas neste teste. A menor degradação foi na cultura de “pool” de bactérias, nas demais culturas o desempenho foi semelhante, havendo menor consumo da glicose pela levedura entre as concentrações 10 e 20 ppm, onde também foi menor o rendimento alcoólico.

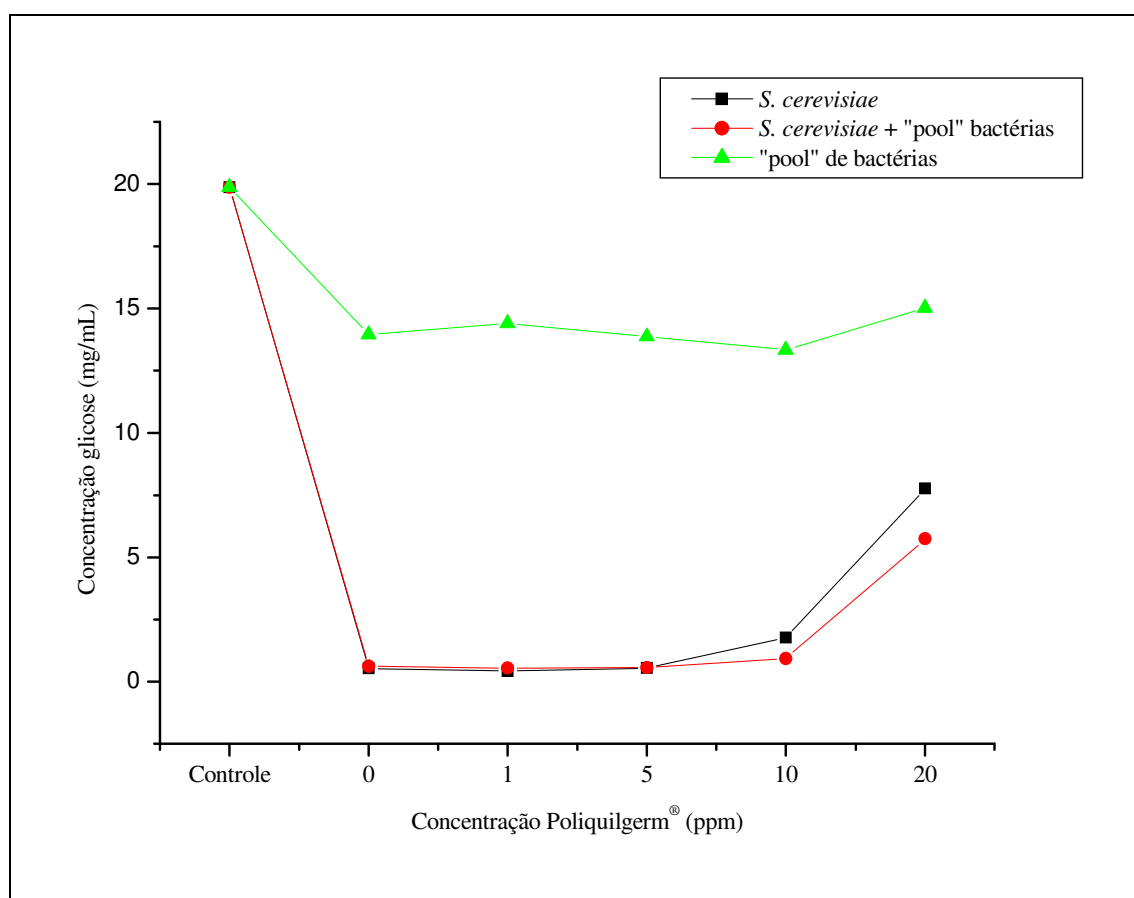


Figura 18. Concentração de glicose residual (mg/mL) frente à ação do Poliquilgerm® conforme cada tratamento em 13h de fermentação em meio CSN a 10°Brix a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$. O controle empregado foi o meio CSN a 10°Brix sem inóculo.

As alterações do nível de pH também foram acompanhadas durante as 13 horas da etapa de fermentação, os resultados estão expressos nas TABELAS 21, 22 e 23, que representam respectivamente as culturas de *S. cerevisiae*; associação de *S. cerevisiae* com “pool” de bactérias e somente bactérias. Esses resultados demonstram a importância do controle das bactérias lácticas, considerando-se somente o pH e relacionado-o com o tempo de cultivo juntamente com diferentes concentrações de Poliquilgerm®; embora apresente uma discreta diminuição, o nível de pH reduz mais no meio sem o produto do que nos tratamentos com o biocida. Dorta et al. (2006), mostraram que pH abaixo de 3,6 causa forte inibição nas linhagens estudadas de *S. cerevisiae* PE-2 e M-26, pois é um fator altamente estressante para a levedura durante

a fermentação, superando o estresse causado por altas concentrações de ácido láctico (6 g l^{-1}), sulfito ($150 \text{ mg SO}_2 \text{ l}^{-1}$) e etanol (9,5%, p/v). Esses fatores causam danos no metabolismo da levedura resultando em lise celular e liberação de aminoácidos e vitaminas no meio favorecendo o crescimento das bactérias lácticas e conseqüentemente levando a uma queda do rendimento alcoólico (OLIVA-NETO e YOKOYA, 1997).

Tabela 21. Alterações nos níveis de pH da cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, acompanhado durante 13 horas de fermentação em meio CSN a 10°Brix a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$

Tempo (h)	Concentração de Poliquilgerm® (ppm)				
	0	1	5	10	20
0	6,17	6,17	6,17	6,17	6,17
3	5,34	5,39	5,80	6,37	6,95
6	4,84	4,88	5,23	5,82	6,67
8	5,70	4,61	4,85	5,32	6,23
10	4,44	4,50	4,66	4,95	5,77
13	4,51	4,62	4,61	4,74	5,14

Tabela 22. Alterações nos níveis de pH da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* mais “pool” de bactérias, acompanhado durante 13 horas de fermentação em CSN a 10°Brix a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação de $100 \pm 10 \text{ rpm}$

Tempo (h)	Concentração de Poliquilgerm® (ppm)				
	0	1	5	10	20
0	6,20	6,20	6,20	6,20	6,20
3	5,06	5,19	5,40	6,12	6,73
6	4,54	4,78	4,93	5,83	5,70
8	4,36	4,56	4,67	5,40	6,59
10	4,19	4,43	4,55	5,09	6,48
13	4,23	4,51	4,61	4,77	6,38

Tabela 23. Alterações nos níveis de pH da cultura do “pool” de bactérias, acompanhado durante 13 horas de fermentação em CSN 10°Brix, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação de $100 \pm 10\text{rpm}$

Tempo (h)	Concentração de Poliquilgerm® (ppm)				
	0	1	5	10	20
0	6,10	6,10	6,10	6,10	6,10
3	4,91	5,14	5,42	5,84	6,47
6	4,22	4,84	5,07	5,53	6,31
8	3,99	4,61	4,79	5,23	6,03
10	3,88	4,45	4,58	4,96	5,81
13	3,87	4,34	4,37	4,70	5,57

6. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos nos experimentos em laboratório, pode-se concluir que:

- O Poliquilgerm[®] apresenta ação biocida sobre *Saccharomyces cerevisiae* quando utilizado na concentração de 200 ppm. Em concentrações menores apresenta ação microbiostática, sendo que até a concentração de 1 ppm a viabilidade da levedura não é afetada a níveis significativos nas primeiras 24 horas;
- Em *Lactobacillus fermentum* o Poliquilgerm[®] mostrou ação bactericida na concentração de 50 ppm. Com 24 horas de tempo de contato nesta concentração a inviabilização do crescimento celular foi total;
- O Poliquilgerm[®] pode ser efetivo no controle de *Lactobacillus fermentum* e de bactérias contaminantes da fermentação etanólica, uma vez que a diminuição na produção de ácido láctico atingiu cerca de 50% na concentração de 0,5 ppm do biocida e 90% em 20 ppm;
- Durante o teste de fermentação verificou-se que o uso do biocida em concentrações inibitórias para o “pool” de bactérias, induz melhores rendimentos alcoólicos nas

culturas contaminadas, obtendo valores semelhantes à cultura controle de *Saccharomyces cerevisiae* livre de contaminantes;

- Os resultados mostram que o açúcar residual da fermentação de 13 horas quando o “pool” de bactérias está presente não sofre alterações mesmo na presença de 10 ppm de Poliquilgerm®;
- Mediante mais estudos, os resultados deste trabalho mostram o Poliquilgerm®, produto de origem natural, tem grande potencial para ser aplicado em fermentações contaminadas por bactérias lácticas induzindo diminuição na produção de ácido láctico e aumento no rendimento fermentativo;
- Diante destes resultados pode-se inferir que o óleo de mamona quimicamente modificado presta-se para fins mais nobres que a simples combustão como biodiesel.

7. REFERÊNCIAS

ALCARDE, V. E.; LACERDA, T. H. M.; MCKNIGHT, I. C. S. Evaluation of parameters that affect the flocculation of yeasts and bacteria isolated from industrial alcohol fermentation process. In: 2nd Mercosul Congress on Chemical Engineering, 2005, Rio de Janeiro. **Anais...**, digital, 8p.

ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. 2003, Fermentation of irradiated sugarcane must. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.60, n.4, p. 677-681, 2003.

BERTOLETTI, A. C. D.; ANGELIS, D. F.; SANTOS, A. M.; CLARO NETO, S.; CHIERICE, G. O. Ação do Poliquilgerm[®] sobre a Microbiota da Fermentação Etanólica no Controle de Contaminantes. In: Sinaferm/XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007a. Curitiba, **Anais...**, digital, 6p.

BERTOLETTI, A. C. D.; ANGELIS, D. F.; SANTOS, A. M.; CLARO NETO, S.; CHIERICE, G. O. Uso de Poliquilgerm[®] no controle de *Lactobacillus fermentum*, contaminante da fermentação etanólica. **Holos Environmet**, Rio Claro, v.7, n.1, supl.1. 2007b. Disponível em: <<http://cecemca.rc.unesp.br/ojs/index.php/holos>>. Acesso em: 20 jan 2008.

BERTOLETTI, A. C. D.; CHIERICE, G. O.; SANTOS, A. M.; ANGELIS, D. F.; CLARO-NETO, S. Viabilidade de *Candida albicans* CCT 0776 in vitro sob atividade antimicrobiana do Poliquilgerm[®] derivado do óleo de *Ricinus communis* L. (mamona). In: Encontro de Biólogos do CRBio-1, São Pedro, 2004, v.15, **Anais...** p.142, 20.

BRAUNBECK, M. D. W. **Efeito de biocidas sobre o comportamento de leveduras e o rendimento da fermentação.** 1988.156f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BREGAGNOLI, F. C. R. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça.** 2006. 69f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CALDWELL, D. R. Fermentation. In:DUBUQUE, W. M.; BROWN, C. **Microbial Physiology & Metabolism.** Publishers, 1995, p.118-138.

CECCATO-ANTONINI, S. R. C. Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria. **Apostila de treinamento:** usina Santa Terezinha. Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2004.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica.** 2003. 124f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Aplicação Industrial do Óleo. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. **O Agronegócio da Mamona no Brasil.** Brasília: Embrapa, 2001. p.89-120.

COSTA, V. M. **Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico.** 2006. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

DIFCO MANUAL – **Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology.** 10ed. Detroit, Michigan: Difco Laboratories, 1984.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; DE ABREU-NETO, M. S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 e M26). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 177-182, 2006.

FALCÃO DE MORAIS, J. O. *et al.* Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mosto de caldo-de-cana de fermentações alcoólicas industriais. Separata de: **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.14, p.6-10, 1983.

FERREIRA, C. M., ROSA, O. P. S.; TORRES, S. A.; FERREIRA, F. B. A.; BERNARDINELLI, N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v.13, n.2, p.118-122, 2002.

FERREIRA, C. M. BONIFÁCIO, K. C. FRONER, I. C. ITO, I. Y. Evaluation of the antimicrobial activity of three irrigating solutions in teeth with pulpal necrosis. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v.10, n.1, p.15-21, 1999 a.

FERREIRA, C. M. **Avaliação “in vitro” da atividade antimicrobiana de substâncias utilizadas em endodontia sobre bactérias anaeróbias.** 1999b.119f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** 1989. 388f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimento) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas.

GARCIA, C. E. **Efeito do nível de contaminação de bactérias isoladas de processo industrial de fermentação alcoólica, na floculação de levedura.** 1999. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GUERRA, E. J.; ANGELIS, D. F. Floculação da levedura induzida por bactérias na fermentação etanólica: I. método de detecção preventiva e estudos para o controle. **Stab: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.16, n. 6, p. 25-27, jul./ago, 1998.

GUERRA, E. J. **Isolamento de bactérias contaminantes da fermentação etanólica que induzem a floculação de *Saccharomyces cerevisiae* e sua sensibilidade a agentes antimicrobianos.** 1995,150f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

HERNÁNDEZ, A. L. **Desfloculação de *Saccharomyces cerevisiae* contaminada com *Lactobacillus fermentum* CCT 1396 por meio de ultra-som.** 2002.86f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

HYNES, S. H.; KJARSGAARD, D. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Use of virniamycin to control the growth of lactic acid bacteria during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.284-291, 1997.

HOLYOAK, C. D.; STRATFORD, M.; MCMULLIN, Z.; COLE, M. B.; CRIMMINS, K.; BROWN, A. J. P.; COOTE, P. J. Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3158–3164, set. 1996.

JAVADEKAR, V. S.; SIVARAMAN, H.; SAINKAR, S. R.; KHAN, M. I. A mannose-binding protein from the cell surface of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* (NCIM 3528): its role in flocculation. **Yeast**, v.16, p. 99-110, jan. 2000.

LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A. B.; TANOMARU FILHO, M.; BONIFÁCIO, K. C.; ITO, I. Y. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. **Journal of Endodontics**. U.S.A, v. 27, n 12, p.717-719, 2001.

LUDWIG, K. M. **Floculação de *Saccharomyces cerevisiae* – caracterização e ação de enzimas desfloculantes**.1998.134f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation by contaminant bacteria from alcoholic fermentation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.21, n.1, p.63-66, jan/abr 2001.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Bioengineering**, v.25, p.103-121, 1983.

MAKANJUOLA, D. B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D. G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, n.5, p.350-357, 1992.

MARQUES, T. A.; SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.24, n.4, p.532-535, out./dez. 2004.

MENEGHIN, S. P., REIS, F. C., ALMEIDA, P. G., CECCATO-ANTONINI, S. R. Avaliação do Emprego de Dióxido de Cloro como Antibacteriano na Fermentação Alcoólica. In: Sinaferm/XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007. Curitiba. **Anais...**, digital, 7p.

MESSETTI, M. A. SANTOS, A. M.; ANGELIS, D. F.; CLARO NETO, S.; CHIERICE, G. O.; DALFRE, I. A. B. Viabilidade de *Escherichia coli* CCT 1457 in vitro sob atividade do Poliquilgerm derivado do óleo de *Ricinus communis* L. (mamona). In: Workshop Internacional de Microbiologia Ambiental, 2005, Campinas. **Anais...**, Unicamp, digital.

MESSETTI, M. A. SANTOS, A. M.; ANGELIS, D. F.; CLARO NETO, S.; CHIERICE, G. O.; DALFRE, I. A. B. Verificação da Atividade do Poliquilgerm® sobre Dextrana, Viscosidade e Crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* (B512F). In: Sinaferm/XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007. Curitiba. **Anais...**, digital, 12p.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p.426 – 428, 1959.

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of Lactobacilli on Yeast-Catalyzed Ethanol Fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Saskatoon, v.63, n.11, p.4158–4163, nov. 1997.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. **Journal American Society of Brewing Chemists**, v.59, n.4, p.187-194, 2001a.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.26, p.171-177, 2001b.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, jan./mar 2007.

OLIVA-NETO, P. **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras**. 1995.183f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

OLIVA-NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. 1990.190f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, v.28, n.1, p.25-31, mar 1997.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, n.6, p.697- 699, 1994.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, p.10-14, 2001.

OLIVEIRA, D. Pesquisa com mamona pode viabilizar biodiesel brasileiro. **Embrapa Algodão**, 2004. Disponível em: <http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2004/agosto/bn.2004-11-25.2707301163/mostra_noticia> Acesso em: 03 ago 2006.

OLIVEIRA, M. G. R. **Estudo da decomposição de sacarose por hidrólise utilizando uma mistura de ésteres derivados do óleo de mamona.** 2005. 98f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R. M.; HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.3, 1998.

OSAVA, M. A Energia de uma semente de mamona, **Tierramerica**, 2003. Disponível em: <<http://www.tierramerica.net/2003/0526/panalisis.shtml>> Acesso em: 11 set 2006.

PULZ, P. **Efeito de agentes químicos e físicos sobre a fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* contaminada com *Lactobacillus fermentum*.** 2002.62f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

ROSALES, S. Y. R. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes.** 1989. 200f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SALOVAARA, H. Lactic Acid Bacteria in Cereal-Based Products. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V. **Lactic Acid Bacteria: microbiology and functional aspects.** 2 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998. p.115-133.

SIQUEIRA, D. C. R. **Avaliação comparative *in vivo* da atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 1%, clorexidina a 2% e do detergente derivado do óleo de mamona a 10%, utilizados como soluções irrigadoras em endodontia.** 2005. 110f. Dissertação (Mestre em Odontologia, área de Endodontia), Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.

SOUZA, M. A. A.; TRÓPIA, M. J.; BRANDÃO, R. L. New aspects of glucose activation of the H⁺-ATPase un the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v.147, p. 2849-2855, 2001.

SOUZA, M. A. C.; MUTTON, M. J. R. Flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processor industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.4, p.893-898, jul/ago 2004.

STRATFORD, M. Yeast flocculation: flocculation onset and receptor availability. **Yeast**, v.9, p.85-94, jan. 1993.

STUPIELLO, M. G. **Avaliação de metodologia para estudo da ação de alguns antimicrobianos frente às bactérias gram (+) isoladas da fermentação alcoólica**. 1993. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

THOMAS, K. C.; HYNES. S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.819, maio 2001.

VENTURA, R.; ANGELIS, D. F. Importância do Monitoramento e Controle da Formação de Ácido Lático na Produção de Etanol. In: Sinaferm/XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007.Curitiba. **Anais...**, digital, 12p.

WHITE, F. H.; KIDNEY, E. Yeast-Bacterium interactions in the brewing industry. In: BUSHELL, M. E.; SLATER, J. H. **Mixed Culture Fermentations**. Londres: Academic Press, 1981, p.121-135.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **Stab: Açúcar, Alcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.9, n.6, p.38-39, 1991.